

**Akrilamidin İnsan Karaciğer Hücre Dizindeki (HepG2)
Sitokrom P450'ye Bağımlı İlaçları Metabolize Eden Enzimler
Üzerine Etkileri**

Proje No: 2009 BSP 009

Yard. Doç. Dr. Şevki ARSLAN

NİSAN 2010
DENİZLİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ ONAY SAYFASI

Yard. Doç. Dr. Şevki ARSLAN yürütücülüğünde hazırlanan 2009 BSP 009 nolu ve “**Akrilamidin İnsan Karaciğer Hücre Dizindeki (HepG2) Sitokrom P450’ye Bağımlı İlaçları Metabolize Eden Enzimler Üzerine Etkileri**” başlıklı **Başlangıç Seviyesi Araştırma Projesi** Kesin Sonuç Raporu Pamukkale Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu’nun/...../20.. tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Emin ERDEM
Koordinatör
......./...../20..

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 2009 BSP 009
Proje Başlığı: Akrilamidin İnsan Karaciğer Hücre Dizindeki (HepG2) Sitokrom P450'ye Bağımlı İlaçları Metabolize Eden Enzimler Üzerine Etkileri
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Yard. Doç. Dr. Şevki ARSLAN
Projenin Yürütüldüğü Birim: Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü
Varsa, Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: Pamukkale Üniversitesi Kınıklı Kampüsü 20020/DENİZLİ
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 17/03/2009-17/03/2010
Özet: Endüstrileşmenin gelişmesiyle birlikte çevreye her yıl binlerce çeşit kimyasal madde atılmaktadır. Bunun sonucu olarak, dünyamızdaki canlılar ve özellikle insanlar, birçoğu toksik olan bu bileşiklere ve kimyasallara maruz kalmaktadırlar. Bu kimyasallardan en önemlilerinden biri akrilamiddir. Akrilamid birçok endüstride sıklıkla kullanılan, nörotoksik, reproduktif toksik ve karsinojenik bir kimyasaldır. Akrilamid birçok sanayide kullanılmasının yanı sıra, yüksek ısıda pişirilmiş karbohidratlı gıdalarda oluştuğu için insanların kolaylıkla maruz kalabilecekleri bir kimyasaldır. Çalışmalar akrilamidin mutajenik, genotoksik, reaktif bir ürün olan glisidamide, sitokrom P450'ye bağımlı monooksijenaz enzimlerinin izozimlerinden P450E1 (CYP2E1) tarafından dönüştürüldüğünü göstermiş ve bu metabolik yol akrilamidin neden olduğu karsinogenesis ile ilişkilendirilmiştir. Ancak, akrilamidin CYP2E1 enzimi ve diğer P450'ye bağlı sitokrom önkarsinojen/karsinojen metabolizmasına olan etkilerini araştıran çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu nedenle, bu çalışmamızda, akrilamidin P450'ye bağımlı ilaçları metabolize eden bazı enzimler üzerine olan etkisi insan karaciğer hücre dizisinde (HepG2) araştırıldı. Bu amaçla; değişik konsantrasyonlarda akrilamid kanser hücre hattı ile muamele edilerek sitotoksik etkisi saptandı. İki değişik konsantrasyonda akrilamidin hücreler ile 48 saatlik inkübasyonları sonunda P450 isoformlarının ekspresyonları aktivite, protein ve mRNA düzeyinde ölçülerek kontrol hücreler ile karşılaştırıldı. CYP1A1-1A2, CYP2E1 ve CYP3A4 isoformlarının aktiviteleri, bu isoformların özgül substratları kullanılarak tayin edildi. Bu isoformların enzim (protein) düzeyi anti-hCYP1A1, 1A2, 2E1 ve 3A4 antikorları kullanılarak Western blot ile tayin edilirken mRNA düzeyleri uygun primerler kullanılarak RT-PCR yöntemi ile belirlendi. 1.25 mM ve 2.5 mM akrilamid konsantrasyonu, HepG2 karaciğer kanser hücrelerinde CYP1A1, CYP1A2 ve CYP2E1 enzim aktivitesi, protein ve mRNA düzeylerinin anlamlı bir şekilde artmasına sebep oldu. Bunun yanısıra, akrilamid CYP3A4'ün mRNA seviyesinde anlamlı bir azalışa sebep olmasına rağmen CYP3A4 enzim aktivitesi ve protein seviyesinde herhangi bir değişime sebep olmamıştır. Akrilamide maruz kalan insanlarda, CYP1A1, CYP1A2 ve CYP2E1 gibi karsinojen metabolizmasında önemli rol oynayan P450 izozimlerinin artması bu enzimler tarafından metabolize edilen benzen, benzopiren, heterosiklik aminler ve akrilamid gibi karsinojenlerin metabolik aktivasyonları sonucunda kanser oluşma riskini artırabilir. Ayrıca, piyasadaki ilaçların yaklaşık 50%'sini metabolize eden CYP3A4'ün akrilamid ile inhibisyonu, ilaçların metabolizmasında bozulmalara ve klinik toksisiteye neden olabilir.
Anahtar Kelimeler: Akrilamid, Sitokrom P450, Toksik Etki, İlaç Metabolize Eden Enzimler
Varsa, Projeden Yapılan Yayınlar: Çalışma, 20. Ulusal Biyoloji kongresinde bildiri olarak kabul edilmiştir.

ÖNSÖZ

Erken teşhis ve tedavideki yeni gelişmelere rağmen, kanser hala ölüm nedeni olarak ilk sıralardaki yerini son 20 yıldan beri korumaktadır. Bu yüzden hastalığı önlemek için kanser oluşumunda büyük pay sahibi olan sigara, alkol ve diyet gibi faktörler son yıllarda daha sık göz önünde bulundurulmaya başlanmıştır. Akrilamid insanların hem sigara ile hem de diyetle maruz kaldıkları, son yıllarda önemi çok artan karsinogenik bir kimyasaldır.

Bu kimyasal, boya, kozmetik ve diğer birçok sanayide sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca, yüksek ısıda pişirilmiş bol karbonhidratlı gıdalarda oluştuğundan ve sigara dumanında bulunduğu için dolaylı olarak insanların kolaylıkla maruz kalabilecekleri bir kimyasaldır. Akrilamid sitokrom P450'ye bağımlı monooksijenaz enzimlerinin bir izozimi olan P4502E1 tarafından metabolize edilerek mutajenik, genotoksik, reaktif bir ürün olan gliseamid'e çevrilir. Ancak, akrilamidin birçok ksenobiyotiğin ve endojen maddelerin metabolizmasında rol oynayan sitokrom P450'ye bağlı önkarsinogen/karsinogen metabolizmasına olan etkilerini araştıran çalışmalar sınırlı sayıda. İnsan karaciğer hücre kültüründe ise böyle bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Çeşitli alanlarda yaygın kullanımı, bazı ürünlerin yapısında bulunması, yüksek miktarda nişasta içeren gıdaların kızartılması sonucu kolayca oluşması ve vücuttaki metabolizması sonucu oluşan metabolitinin nörotoksik, reproduktif toksik ve karsinogenik özellikleri akrilamidi insan sağlığı açısından önemli yapmaktadır. Tüm bunların ışığında, bu çalışma, akrilamidin insan karaciğer hücre dizisinde sitokrom P450'ye bağımlı ilaçları metabolize eden bazı enzimler üzerine olan etkisinin incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

Bu amaçla iki değişik konsantrasyonda akrilamidin insan karaciğer hücrelerinde (HepG2) sitokrom P450 bağımlı ilaçları metabolize eden enzimlerin izoformlarından olan CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1 ve CYP3A4 enzimleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu izozimlerin substratları kullanılarak enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Ayrıca akrilamidin bu izozimlerin protein ve transkript düzeylerine olan etkisi tespit edilerek olası transkripsiyonel ve/veya translasyonel mekanizmaları hakkında da bilgi edinilmiştir. Elde edilen bulgular, CYP1A1, CYP1A2 ve CYP2E1 izozimlerin akrilamid uygulaması sonucunda anlamlı derecede arttığını, CYP3A4'ün ise azaldığını göstermiştir. Bu izozimlerin akrilamidle değişmesi sonucunda, bu kimyasala maruz

kalan insanlarda kanser oluşum riski, klinik toksisite ve ilaçların metabolizmasında bozulmalar artabilir.

Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (PAUBAP) Başlangıç Seviyesi Araştırma projesi olarak sunduğumuz bu alışma PAUBAP tarafından 2009 BSP 009 kodu ile desteklenmiştir. Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine destekleri için teşekkürlerimizi sunuyoruz.

Yard. Doç. Dr. şevki ARSLAN

ÖZ

Akrilamidin İnsan Karaciğer Hücre Dizindeki (HepG2) Sitokrom P450'ye Bağımlı İlaçları Metabolize Eden Enzimler Üzerine Etkileri.

Endüstrileşmenin gelişmesiyle birlikte çevreye her yıl binlerce çeşit kimyasal madde atılmaktadır. Buna ilave olarak, teknolojinin ilerlemesi ve tıp alanındaki gelişmelerle birlikte her gün yeni bir ilaç çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla üretilmektedir. Bunun sonucu olarak, dünyamızdaki canlılar ve özellikle insanlar, birçoğu toksik olan bu bileşiklere ve kimyasallara maruz kalmaktadırlar. Bu kimyasallardan en önemlilerinden biri akrilamidir. Akrilamid birçok endüstride sıklıkla kullanılan, nörotoksik, reproduktif toksik ve karsinojenik bir kimyasaldır. Akrilamid aynı zamanda yüksek ısıda pişirilmiş karbohidratlı gıdalarda oluştuğu için insanların kolaylıkla diyetlerinde maruz kalabilecekleri bir kimyasaldır.

Çalışmalar akrilamidin mutajenik, genotoksik, reaktif bir ürün olan glisidamide, sitokrom P450'ye bağımlı monooksijenaz enzimlerinin izozimlerinden P4502E1 (CYP2E1) tarafından dönüştürüldüğünü göstermiş ve bu metabolik yol akrilamidin neden olduğu karsinojenisite ile ilişkilendirilmiştir. Ancak, akrilamidin CYP2E1 enzimi ve diğer P450'ye bağlı sitokrom önkarsinojen/karsinojen metabolizmasına olan etkilerini araştıran çalışmalar sınırlı sayıdadır. İnsan karaciğer hücre kültüründe ise böyle bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Çeşitli alanlarda yaygın kullanımı, bazı ürünlerin yapısında bulunması ve vücuttaki metabolizması sonucu oluşan metabolitin karsinojenik olması, akrilamidi insan sağlığı açısından önemli yapmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı, akrilamidin P450'ye bağımlı ilaçları metabolize eden bazı enzimler üzerine olan etkisinin insan karaciğer kanser hücre dizisinde (HepG2) aydınlatılmasıdır. Bu amaçla; değişik konsantrasyonlarda akrilamid kullanılarak akrilamidin sitotoksik etkisi HepG2 hücre hattında saptandı. Elde edilen sitotoksosite sonuçlara göre, 1.25 mM ve 2.5 mM akrilamid konsantrasyonu seçilerek, sitokrom P450 izozimlerinin nasıl etkilendiği belirlendi. İki farklı konsantrasyonda akrilamid uygulanması, CYP1A1 ve CYP1A2' ye bağlı etoksiresorufin O-deetilaz ve metoksiresorufin O-demetilaz aktiviteleri ile bu izozimlerin protein ve mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa sebep oldu. ($p < 0.05$). Benzer şekilde, CYP2E1 bağımlı anilin 4-hidroksilaz aktivitesi ile protein ve mRNA seviyeleri akrilamid uygulanması sonucunda arttığı bulundu. Bunların aksine, CYP3A4'e bağımlı eritromisin N-demetilaz aktivitesi ve protein seviyesi her iki konsantrasyonda herhangi bir değişikliğe sebep olmazken, aynı izozimin mRNA seviyesi konsantrasyona bağımlı bir şekilde azalmıştır. Bu veriler ışığında, sitokrom P450 izozimlerinin akrilamid uygulaması ile hem aktivite, hem de protein ve mRNA seviyelerinin değişmesi sonucunda, bu kimyasala maruz kalan insanlarda kanser oluşum riski, klinik toksisite ve ilaç metabolizmasında bozuklukların görülme olasılığı artabilir.

ABSTRACT

Effects of Acrylamide on Cytochrome P450 Dependent Drug metabolizing Enzymes in Human Liver Cell Line (HepG2).

In each year, thousands of different chemicals are released into environment with industrial development. In addition to this, in each day, a new drug is produced for treatment of various diseases in parallel to the technological improvement and medicinal development. In consequence of this, organisms in earth, especially humans, are exposed to the these mostly toxic chemicals. One of the most important chemical among these chemicals is acrylamide. Acrylamide is one of the most widely used chemical in various industrial sites with its known neurotoxic, reproductive toxin and carcinogenic effects. Humans are exposed to acrylamide simply in their diet due to formation of acrylamide in carbohydrate rich foods cooked at higher temperatures.

Studies have demonstrated that acrylamide is metabolized to mutagenic, genotoxic and carcinogenic metabolite, glycidamide by P4502E1 (CYP2E1), one of the isozyme of cytochrome P450 dependent monooxygenase enzymes, and the carcinogenicity associated with acrylamide is mostly attributed to this metabolism. However, studies regarding the effects of acrylamide on CYP2E1 enzyme and on other cytochrome P450 dependent procarcinogen/carcinogen metabolism are limited. There are no available studies related to the effects of acrylamide on this system in human liver cell culture in literature. Due to its wide usage, presence of in some products, and its carcinogenic metabolite formed as a result of metabolism in body, acrylamide is turned out to be very important for human health. In this regard, the aim of this study is to elucidate the effects of acrylamide on cytochrome P450 dependent drug metabolizing enzymes in human hepatoma cell line (HepG2). For this purpose, cytotoxic effect of acrylamide was determined in HepG2 cell line by using various concentrations of this chemical. The effects of acrylamide on cytochrome P450 isozymes were determined by choosing 1.25mM and 2.5mM acrylamide concentration according to the cytotoxicity results. Acrylamide treatment in two different concentrations was caused statistically significant increase in CYP1A1 and CYP1A2 associated ethoxyresorufine O-deethylase and methoxyresorufine O-demethylase activities and protein and mRNA levels of these isozymes ($p < 0.05$). Similarly, it was found that CYP2E1 associated aniline 4-hydroxylase activity and protein and mRNA levels increased by acrylamide treatment. On the other hand, although CYP3A4 associated erythromycin N-demethylase activity and CYP3A4 protein level was not changed significantly, the mRNA level of this isozyme was decreased in concentration dependent manner. In the light of these data, in acrylamide exposed people, the probability of cancer formation risk, clinical toxicity and disturbance in drug metabolism may be increased due to changes in P450 isozymes at both activity and protein and mRNA levels by acrylamide treatment.

İÇİNDEKİLER

1	GİRİŞ	12
2	MATERYAL ve METOT.....	21
2.1	Hücre Kültürü.....	21
2.2	Sitotoksosite Deneyi.....	21
2.3	Bişinşonik Asit ile Protein Tayini.....	21
2.4	Akrilamidin Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Rol Oynayan P450 Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Tayini.....	22
2.4.1	Anilin 4-Hidroksilaz Aktivite Tayini (CYP2E1).....	22
2.4.2	Alkoksirezorifin O-Dealkilaz (AROD) Aktivite Tayini (CYP1A1 CYP1A2).....	23
2.4.3	Eritromisin N-Demetilaz Aktivite Tayini (CYP3A4).....	25
2.5	CYP İzozimlerinin Protein Ekspresyon Düzeyinin Tayini.....	27
2.5.1	SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	27
2.5.2	Western Blot Analizleri.....	29
2.6	CYP İzozimlerinin mRNA Ekspresyon Düzey Tayini.....	30
2.6.1	Hücre Hattından Total RNA İzolasyonu.....	30
2.6.2	cDNA Sentezi.....	31
2.6.3	Yarı Kuantifiye Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR).....	31
3	BULGULAR.....	34
3.1	Farklı Konsantrasyonlarda Akrilamidin Sitotoksik Etkisi.....	34
3.2	Akrilamidin CYP450 Enzim Aktivitelerine Etkileri.....	35
3.3	CYP450 İzozimlerinin Protein Ekspresyon Düzeylerinin Tayini.....	36
3.4	CYP450 İzozimlerinin mRNA Ekspresyon Düzey Tayini.....	39
4	TARTIŞMA.....	46
5	SONUÇ.....	48
6	KAYNAKLAR.....	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Akrilamidin kimyasal yapısı	12
Şekil 1.2 Akrilamidin metabolizması.....	13
Şekil 1.3 P450 sisteminin katalitik döngüsü	18
Şekil 2.1 Anilin 4-hidroksilaz enzimatik reaksiyonu.....	22
Şekil 2.2 Alkoksirezorifin dealkilasyonu.....	24
Şekil 2.3 Eritromisin N-demetilasyonu	25
Şekil 3.1 Değişik konsantrasyonlardaki akrilamidin hücre canlılığına etkisi.....	34
Şekil 3.2 HepG2 hücrelerinde CYP1A2 ekspresyon düzeyi.....	36
Şekil 3.3 HepG2 hücrelerinde CYP2E1 ekspresyon düzeyi	37
Şekil 3.4 HepG2 hücrelerinde CYP3A4 ekspresyon düzeyi.....	38
Şekil 3.5 İzole edilen RNA'ların 1%'lik agaroz jel elektroforezi	39
Şekil 3.6 Akrilamidin İnsan Karaciğer Hücre hattında CYP1A1 mRNA seviyesine olan etkisi.....	40
Şekil 3.7 Akrilamidin İnsan Karaciğer Hücre hattında CYP1A1 mRNA seviyesine olan etkisi.....	40
Şekil 3.8 Akrilamidin İnsan Karaciğer Hücre hattında CYP1A2 mRNA seviyesine olan etkisi.....	41
Şekil 3.9 Akrilamidin İnsan Karaciğer Hücre hattında CYP1A2 mRNA seviyesine olan etkisi.....	42
Şekil 3.10 Akrilamidin İnsan Karaciğer Hücre hattında CYP2E1 mRNA seviyesine olan etkisi.....	43
Şekil 3.11 Akrilamidin İnsan Karaciğer Hücre hattında CYP2E1 mRNA seviyesine olan etkisi.....	43
Şekil 3.12 Akrilamidin İnsan Karaciğer Hücre hattında CYP3A4 mRNA seviyesine olan etkisi.....	44
Şekil 3.13 Akrilamidin İnsan Karaciğer Hücre hattında CYP3A4 mRNA seviyesine olan etkisi.	45

TABLolar DİZİNİ

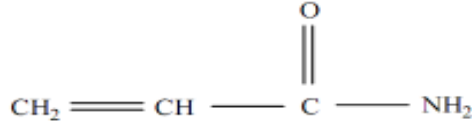
Tablo 2.1 HepG2 hücreleri için Anilin 4-hidroksilaz ölçüm karışımın içeriği.....	23
Tablo 2.2 HepG2 hücreleri için EROD ve MROD ölçüm karışımının içeriği	24
Tablo 2.3 HepG2 hücreleri için Eritromisin N-Demetilaz ölçüm karışımının içeriği.....	26
Tablo 2.4 SDS-PAGE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonu	27
Tablo 2.5 Parçalama tamponu çözeltileri.....	31
Tablo 2.6 Seçilen CYP450 genleri için tanımlanan primer dizileri ve yapışma sıcaklıkları	32
Tablo 2.7 RT-PZR prosedürü.....	33
Tablo 3.1 İki değişik konsantrasyonda akrilamidin CYP1A1-1A2, 2E1 ve 3A4 bağlı enzim aktivitelerine olan etkisi	35

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
cm	Santimetre
CO_2	Karbondioksit
CYP	Sitokrom P450
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonicacid)
APS	Amonyum persülfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylthylene-diamine
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
KPi	Potasyum fosfat
Na_2CO_3	Sodyum karbonat
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
TCA	Trikloro asetik asit
MgCl_2	Magnezyum klorür

1. GİRİŞ

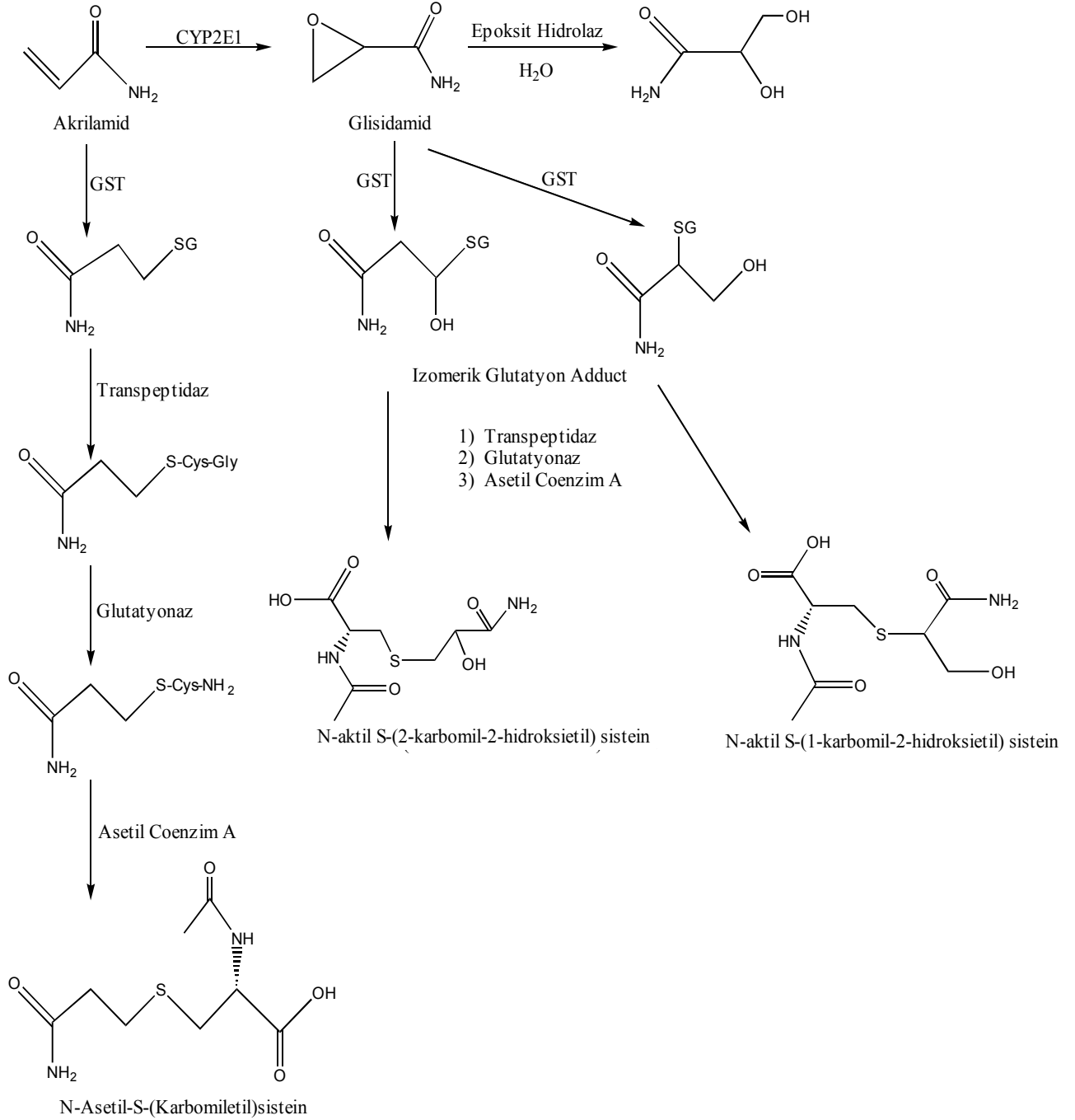
Akrilamid 2-propenoamid, etilen karboksamid, akrilik asit amid olarak bilinen doymamış çift bağ içeren bir amiddir (Şekil 1.1). Sıvı halde iken beyaz bir kristal gibi görülen, kokusuz ve suda, alkolde ve asetonda yüksek çözünürlüğe sahip bir kimyasaldır. Erime sıcaklığı 84,5⁰C ve kaynama sıcaklığı (25 mm Hg) 125⁰C'dir.



Şekil 1.1. Akrilamidin kimyasal yapısı

Akrilamid ve polimerleri boya, kozmetik, gıda, inşaat ve diğer birçok sanayide sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca akrilamid polimeri, içme ve atık sularının iyileştirilmesinde, partikülleri ve diğer katışık maddeleri temizlemede, kâğıt üretiminde kullanılmaktadır (Friedman, 2003; Exxon, 2006). Bunların yanı sıra, yüksek ısıda pişirilmiş bol karbonhidratlı gıdalarda oluştuğu ve sigara dumanında bulunduğu için insanların kolaylıkla maruz kaldıkları bir kimyasaldır (Smith, 1999; Rosen ve Helenas 2002; Tareke ve ark., 2008). Akrilamid yüksek sıcaklıklarda pişirilmiş veya işlem görmüş nişasta ve asparajın bakımından zengin olan bazı gıdalarda (patates ve mısır gevreği, patates kızartma, tost edilmiş ekmek, bisküvi, kraker, cips) Millard reaksiyonu sonucunda oluşmaktadır (Mottram ve ark., 2002; Stadler ve ark., 2002). Gıdalarda oluşan akrilamid miktarı yüksek sıcaklıkta bekleme süresi, pH, sıcaklık, indirgeyici şeker miktarı ile artmaktadır (Zhang and Zhang, 2007). Akrilamid solunum yoluyla, dermal olarak ve sindirim yoluyla vücuda alınmaktadır. Kan ve diğer vücut sıvılarıyla tüm vücuda dağılmaktadır. Aynı zamanda bu kimyasal kan-beyin bariyerini ve plazental bariyerleri kolaylıkla geçebilmektedir (Schettgen ve ark., 2002; Sörgel ve ark., 2002; Friedman, 2003; LoPachin, 2004). Son yıllarda yapılan çalışmalar akrilamidin vücutta iki değişik yolla metabolize edildiğini göstermiştir: Bunlardan baskın olanı akrilamidin karaciğer P450 enzimlerinden CYP2E1 tarafından epoksit formu olan glisidamide dönüştüğü metabolik yoldur. (Sumner ve ark., 1999; Adler ve ark., 2000; Ghanayem ve ark., 2000). Diğer yol ise akrilamidin GSH ile konjugasyonundan meydana gelmektedir

(Sumner ve ark., 1997, 1999; Ghanayem ve ark., 2005a; Krueyebashi ve Ohno, 2006). Bu yol akrilamidin toksik özelliklerini azaltan yoldur. Akrilamid metabolizması şekil 1.2’de gösterilmektedir.



Şekil 1.2. Akrilamid metabolizması (Fennell ve ark., 2005’ten alınmıştır).

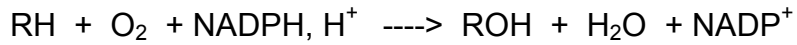
Yukarıda belirtildiği üzere akrilamid sitokrom P450'ye bağımlı monooksijenaz enzimlerinin bir izozimi olan P4502E1 tarafından metabolize edilerek reaktif bir ürün olan glisidamid'e çevrilir ve bu metabolik yol akrilamidin neden olduğu karsinogenisite ile ilişkilendirilmiştir (Sumner ve ark., 1999; Adler ve ark., 2000; Ghanayem ve ark., 2000). Bu ürün bir epoksit olup DNA ve proteinlerle kolaylıkla reaksiyona girer ve sonunda mutajenik bir etki gösterir (Adler ve ark., 2000; Yousef ve El-Demerdash, 2006). Bunun sonucunda fare ve sıçan gibi deney hayvanlarında akciğer, testis, tiroid bezi, rahim, göğüs gibi birçok bölgesinde kansere sebep olmaktadır. (Johnson ve ark., 1986; Friedman, 1995; Klaunig, 2008; Parzefall, 2008). Akrilamidin karsinogenik etkisinin yanında nörotoksik ve reproduktif toksik özellikleri de bilinmektedir. Bu kimyasal insanlarda ve deney hayvanlarında ataksi, iskelet kası zayıflıkları, ellerde ve ayaklarda uyuşukluk ile karakterize edilen nörotoksik etki göstermektedir (Edwards and Parker, 1977; Hagmar, 2001; LoPachin ve ark., 2002; LoPachin, 2004). Nörotoksik etkilerinin yanı sıra reproduktif toksik özellikleride sıçan ve farelerde çalışılmıştır (Adler ve ark., 2000; Tyl ve ark., 2000; Tyl ve Friedman, 2003; Ghanayem 2005b). Yavru büyüklüğünde azalma, sperm sayısında azalma, normal olmayan sperm, çiftleşme sayısında azalma gibi birçok özelliklerle karakterize edilen reproduktif toksisiteye neden olmaktadır (Friedman, 2003).

Sitokrom P450 monooksijenaz enzim sistemi; steroidler, yağ asitleri, prostoglandinler, lökotrienler ve daha birçok doğal bileşiklerin olduğu kadar karsinogenlerin, mutajenlerin ve ilaçların oksidatif metabolizmasına katılan 'hemtiyolat' yapısında protein enzimlerden oluşur. Genellikle, çok bileşkenli elektron transport zincirlerinde terminal oksidaz olarak etki eder ve P450 içeren monooksijenaz sistemleri olarak adlandırılırlar (Lu ve Lewin 1974; Nebert vd, 1987). Bu sistem hepatositlerde yüksek miktarlarda bulunur. Karaciğer dışında; bağırsaklar, böbrekler, akciğer ve beyinde, büyük ölçüde de hücrelerin düz endoplazmik retikulumunda yer alırlar. Ayrıca, böcek ilaçları, prokarsinogenler, anestezi malzemeleri, organik çözücüler gibi ksenobiotiklerin metabolizmasında bulunurlar (Nebert ve Gonzales, 1987; Zimniak ve Waxman, 1993; Magnusson ve Sandström, 2004; Szoktakova vd., 2004). Endojen sentezlenen birçok bileşik, sitokrom P450 enzimlerinin substratı olarak görev yapar. Bu bileşikler: prostaglandin ve lökotrienler dâhil yağ asitleri, steroidler, yiyecek katkı maddeleri ve ilaçlar yanında besinlerle, enjeksiyonla, havadan solunumla ya da deriden absorpsiyonla vücuda giren endüstriyel maddelerdir (Benet vd, 1996). Sitokrom P450'ler endojen ve ekzojen bileşiklerin metabolizmasında önemli olan Faz I enzimlerinin bir ailesini teşkil ederler

(Gonzales ve Yu, 2006). Bunlar bakterilerden memelilere kadar çalışılmış tüm türlerde bulunan, yapısal ve fonksiyonel olarak benzer hemoproteinler içeren bir gen süper ailesinin üyesidir (Nelson vd, 1996; Werck-Reichhart ve Feyereisen, 2000).

Prokaryotik enzimler çözünebilir bir hemoprotein iken, yüksek organizmalarda membrana bağlıdır. Memelilerde, mitokondriyal iç membranda ve endoplazmik retikulum membranlarında yerleşmiştir (Werck-Reichhart ve Feyereisen, 2000). Sitokrom P450 sistemi, katalitik fonksiyonları bilinmeden önce spektral özellikleri ile tanımlanan proteinlerden oluşmuştur. Bu gruptaki proteinlerin benzersiz bir absorptans spektrumu vardır. Genellikle mikrozom olarak adlandırılan endoplazmik retikulum veziküllerinden hazırlanan süspansiyondan karbondioksit gazı geçirildikten sonra sodyum ditiyonat gibi indirgeyici bir ajan eklenince spesifik bir absorptans spektrumu elde edilir. Bu işlem sırasında indirgenmiş hem proteinine CO bağlar ve 450 nm'de pik yapan absorptans spektrumu elde edilir. Bu pigmentlere P450 adı, 450 nm'de absorptans gösterdiği için verilmiştir. Spesifik P450 formları, 446 ile 442 nm arasında maksimum absorptans veren dalga boylarına sahiptir. İnsanlarda ve diğer çoğu memelide P450'ler; steroid hormonların biyosentezi, antibiyotikler, karsinojenler, organik çözücüler, boyalar, pestisitler, alkoller, çevresel kimyasallar gibi ksenobiyotiklerin aktivasyonu ya da inaktivasyonu, doymuş yağ asitlerinin hücresel mesajcılara oksidasyonu, yağda çözünen vitaminlerin stereo ve bölge-özellikli metabolizması gibi reaksiyonların katalizlenmesinde önemli rol oynarlar (Arinc ve Philpot, 1976; Porter ve Cooni 1991; Oleksiak vd., 2002).

Sitokrom P450 tarafından katalizlenen genel reaksiyon aşağıdaki gibidir.



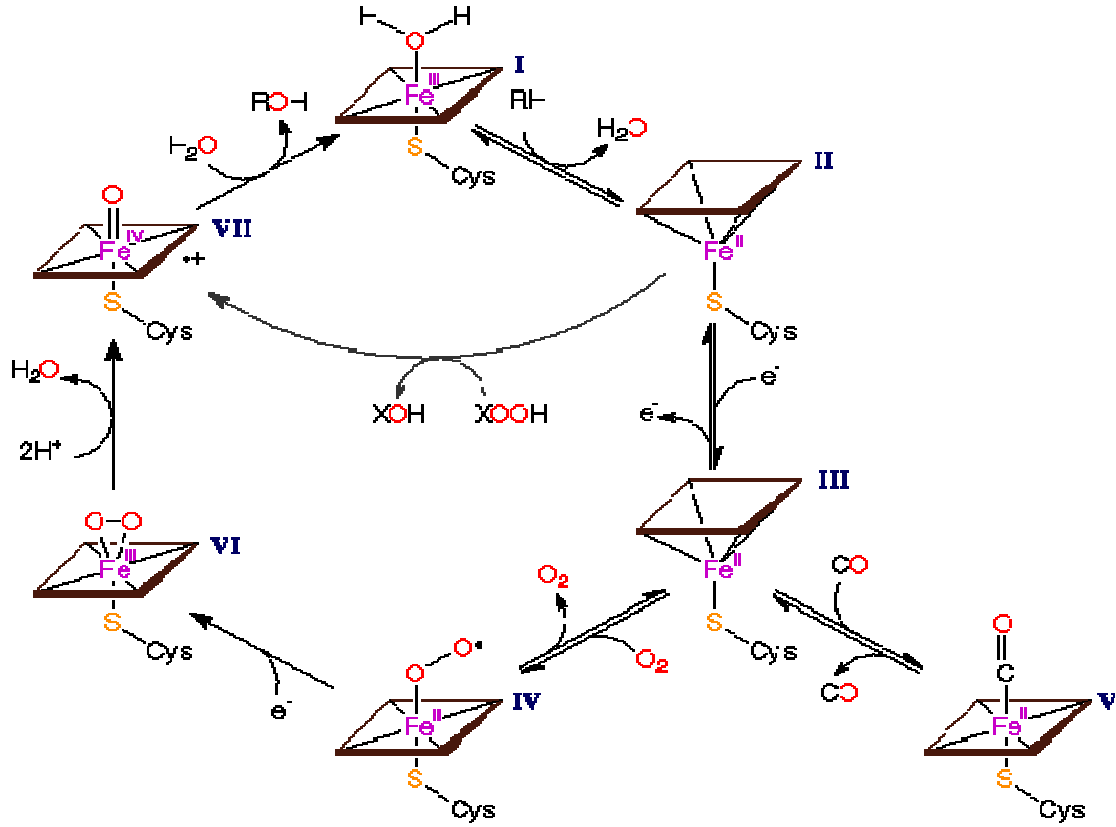
Reaksiyonda substrat (R) alkan, aromatik halka ya da heterosiklik sübstitüentler gibi oksijenasyon için olanak veren bir bölgeye sahiptir. Substrata, iki oksijen atomundan sadece biri katıldığı için bu reaksiyona monooksijenasyon reaksiyonu ve bu enzimlere de sitokrom P450 monooksijenaz enzimleri (EC 1.14.14.1) adı verilmektedir.

Spesifik detoksifikasyon reaksiyonları, çeşitli diyetsel veya ksenobiyotik bileşkenlerin varlığında, organizmanın yaşı ve cinsiyetine, genetik yapısına ve yaşam tarzındaki alışkanlıklarına bağlı olarak ya indüklenmekte ya da inhibe olabilmektedir. Hem endojen hem de ekzojen bileşikler tarafından çeşitli sitokrom P450'lerin indüklendiği 1960'lı yıllardan beri bilinmektedir. Bazı hastalık durumlarında detoksifikasyon aktiviteleri indüklenirken diğer bazı koşullarda bu aktiviteler inhibe olmaktadır. İnhibisyon iki veya daha fazla bileşkenin aynı detoksifikasyon enzimi için yarışmasından olabilir. Bazı bileşenler sadece bir detoksifikasyon enzimini seçici olarak inhibe ederken bazıları tüm sitokrom P450 faz I enziminin aktivitesini inhibe etmek için sitokrom P450'nin reaktif bölgesi olan hem demirine direk olarak bağlanırlar. Bazı faz II enzimlerinin genel inhibisyon mekanizması ise gerekli kofaktörlerin eksikliğine dayanmaktadır (Liska 1998).

Sitokrom P450 proteinlerinin aktif bölgesi hidrofobik etkileşimlerle bağlanmış tek bir demir protoporfirin IX içerir ve oluşan hem proteininde hem bir oksijen molekülünün hem de substratların (RH) bağlanabileceği bölgeleri vardır. Hem grubu demir atomunun beşinci ligandı, sistein kalıntısından sağlanan tiyolat anyonudur ve P450'lerin olağandışı spektral ve katalitik özelliklere sahip olmasını sağlar. Altıncı ligand yer değiştirebilen su molekülü tarafından kullanılmaktadır. Substrat katalizinde demirin indirgenmesi reaksiyonunda oksijen altıncı konuma bağlanmaktadır (Porter ve Coon, 1991).

Sitokrom P450 proteinleri arasındaki sekans benzerliği hayli düşüktür. (%20'den daha az) ve yalnızca tamamen korunmuş 3 aminoasit içerirler. En yüksek yapısal korunmuş bölge, hem protein çevresinde, oksijen aktivasyonu ve elektron-proton transferlerinin genel bir mekanizmasını yansıtan merkez proteinindedir. Bu korunmuş merkez bölgesi 4 heliks demeti (D, E, I ve L), paket, J ve K heliksleri, 2 set β plaka ve bir oyuk yapısından oluşmuştur. Bu bölge; hem demire beşinci ligand şeklinde bağlanan ve mutlak korunan sistein kalıntısı yanı sıra L heliksinden hemen önce hem yapısının proksimal yüzeyinde yerleşmiş olan karakteristik P450 dizisini (Phe-X-X-Gly-X-Arg-X-Cyc-X-Gly) kapsayan hem bağlanma boşluğunu 'loop'; K heliksi içerisinde yer alan ve merkez yapısını stabilize ettiği düşünülen, mutlak korunmuş Glu-X-X-Arg motifini; hem proteinin distal bölgesinde proton transfer oluşunu oluşturan ve P450 imgesi olarak kabul edilen (Ala/Gly-Gly-X-Asp/Glu-Thr-Thr/Ser) L heliksini merkez bölgesini içerir (Werck-Reichhart ve Feyereisen, 2000).

Genel olarak P450'ler reaksiyon döngüsüne girerler (Şekil 1.3). Bilinen tüm sitokrom P450'lerdeki hem demiri, porfirin halkasındaki 4 nitrojen atomuna ve 2 aksiyal liganda bağlıdır. Aksiyal ligandların birinde molekülün karboksil ucuna yakın yerleşmiş sistein kalıntısında bir sülfidril grubu bulunur. Çeşitli bileşiklerin oksidasyonu sırasında elektronlar NADPH'dan, NADPH Sitokrom P450 redüktaz tarafından sitokrom P450'ye transfer edilir. Hem demiri düşük ve yüksek spinli olmak üzere iki farklı spin durumunda bulunabilir. Düşük ve yüksek spinli durumlar demir atomunu çeviren elektronik alanlar olarak tanımlanabilir. Sitokrom P450 molekülü bir substrata bağlanınca bu elektronik alanlarda etkileşim meydana gelir ve hemdeki demir atomu düşük spinden yüksek spine geçer. Oksidasyon (monooksijenasyon) reaksiyon mekanizmasında, oksijenin hem demirine bağlanabilmesi için hemdeki demir ferik (Fe^{3+}) durumdan ferro (Fe^{2+}) duruma indirgenmelidir. Substrata bağlı, yüksek spin (-170mV), substrata bağlanmayan düşük spine (-270mV) göre daha fazla pozitif indirgenme potansiyeline sahip olduğu için Sitokrom P450, NADPH'dan elde edilen elektronlarla indirgenebilir durumdadır. İlk elektron transferiyle indirgenen sitokrom P450 daha sonra oksijenlenir ve NADPH'dan ikinci bir elektron oksijene bağlanarak, oksijen radikaline dönüştürülebilir. Bir iç oksidoredüksiyon neticesinde hidroksillenmiş substratın (ROH) ve suyun oluşumu gerçekleşir, serbest sitokrom P450 Fe^{+3} formunda rejenere olur. Monooksijenasyon reaksiyonunda toplam 2 elektron (e^-) gereklidir. Elektronlar sitokrom P450 molekülüne tek tek transfer edilir. (Schenkman, 1991) NADPH- sitokrom P450 redüktazdan sitokrom P450'ye elektron transferine lipitlerin yardımcı olduğu gösterilmiştir.



Şekil 1.3. P450 Sisteminin Katalitik Döngüsü

Günümüzde sitokrom P450'lerin omurgalı ve omurgasız hayvanlar, bitkiler ve bakterileride içeren ökaryot ve prokaryot organizmalarda bulunduğu gösterilmiştir. Sitokrom P450'lerin birçok reaksiyonu katalizlemelerinden dolayı enzimlerin isimlendirilmesinde sıradan metot yetersiz kalmış ve yapısal homolojiye dayanan sistematik bir adlandırma geliştirilmiştir. Sitokrom P450 enzimleri baz dizilimi benzerliklerine, kontrol eden gen ailelerine ve substrat spesifikliğine göre sınıflandırılmaktadır. Bu adlandırma evrensel olarak kabul edilmiştir. (Nebert vd., 1987) Bu sistemde, CYP terimi sitokromun 'cytochrome' ilk iki harfini ve P450'nin ilk harfini temsil eder. Bu terim bir gen ya da sitokrom P450 gibi bir proteinin başlangıcının dizaynı için kullanılır. Aileyi belirlemek için rakamlar verilir ve bunu alt aileyi belirlemek için büyük harflerin kullanılması izler. Özgün P450'yi tanımlamak için rakamlar kullanılır. Günümüzde bilinen 18 memeli P450 gen ailesi **43** alt aileye bölünmüştür. Aynı ailenin üyeleri en az %40 homolog aminoasit dizisini paylaşır ve aynı alt ailenin üyeleri en az %55 homolog diziyi paylaşır.(Nelson vd,1996)

İnsanda bulunan 59 CYP450 izozimleri üç genel gruba ayrıştırılabilir. 1) Daha çok ksenobiyotik metabolizmasında yer alan CYP aileleri (CYP1-3), 2) Endojen metabolizmasında rol alan CYP aileleri (CYP5-51) ve 3) Yağ asitleri metabolizmasında ve kısmen ksenobiyotik metabolizmasında yer alan CYP4 ailesi. Bunlardan ilk grup günümüzde kullanılan ilaçların Faz I bağımlı metabolizmalarının yaklaşık % 70-80'ini gerçekleştiren sitokrom P450 enzimlerini içerir (Evans ve Relling, 1999). Diyet, tür, genetik, yaş, fizyopatolojik şartlar ve çeşitli ajanlar sitokrom P450 enzimlerinin aktivite ve ekspresyon düzeylerini etkilerler. Sitokrom P450 ailesi 1A1, 1A2 ve 1B1 izoformlarını kapsar ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve heterosiklik aromatik aminler gibi prokarsinojenlerin aktivasyonunda ve biyotransformasyonunda önemli rol oynar. Akciğer kanseri (McLemore ve ark. 1990), kolorektal kanser (Sivaraman ve ark. 1994) ve meme kanseri (Jefcoate ve ark. 2000) gibi karsinojenik oluşumlarda CYP1 izoformlarının önemli rol oynadığı gösterilmiştir. CYP2E1 etanol ile indüklenebilen, küçük moleküler ağırlıklı bileşiklerin ve asetaminofen gibi yaygın olarak kullanılan ilaçların biyotransformasyonunda rol alan ve karsinojen (özellikle arilaminlerin) metabolizmasında hayli öneme sahip olan bir diğer CYP izoformudur. Ayrıca, aseton, asetat ve laurik asit, oleik asit gibi uzun zincirli yağ asitleri gibi endojen maddelerinde metabolizmasında önemli rol oynar (Lieber, 1999; Klaz ve Ammon, 1998). CYP1 izoformların aksine CYP2E1 transkripsiyonel kontrolün yanı sıra post-transkripsiyonel olarak da kontrol edilen ve bu anlamda CYP izoformları arasında farklılık gösteren bir izoformdur. Bu izoformun diyabet ve açlık gibi bazı patofizyolojik durumlarda indüklendiği bilinmektedir (Hong ve ark., 1987; Arınç ve ark., 2005 ve 2007). CYP süper ailesinin insanda en fazla ifade edilen izoformu olan CYP3A4 bilinen terapötik ajanların %50'sinden fazlasının metabolizmasında yer alması nedeni ile de hayli önem arz eden bir diğer CYP izoformudur. CYP3A4 antibiyotikler (eritromisin), yatıştırıcılar (midazolam), bağışıklık sistemi ayarlayıcıları (siklosporin), anti-viral ilaçlar (ritonavir and saquinavir), anti-histaminler (astemizole), kalsiyum kanal bloklayıcıları (nifedipine and verapamil), HMG KoA redüktaz inhibitörleri (lovastatin), uyarıcılar gibi birçok değişik ilacı metabolize eder (Martin and Krum, 2003; Arayne ve ark., 2005; van Herwaarden ve ark., 2005; Sica, 2006; Sugimoto ve ark., 2006; de Wildt ve ark., 2007; Klotz, 2007). Ayrıca bu izozim, testosteron, progesteron, ve androstenedion gibi endojen maddelerin metabolizmasında önemli rol oynar (Yamazaki ve Shimada, 1997; Wang ve ark., 2000).

Çalışmalar akrilamidin mutajenik, genotoksik, reaktif bir ürün olan glisidamide, sitokrom P450'ye bağımlı monooksijenaz enzimlerinin izozimlerinden P4502E1 (CYP2E1) tarafından dönüştürüldüğünü göstermiş (Adler ve ark , 2000; Ghanayem ve ark., 2000) ve bu metabolik yol akrilamidin neden olduğu karsinogenisite ile ilişkilendirilmiştir. Ancak, akrilamidin CYP2E1 enzimi ve diğer P450'ye bağımlı sitokrom önkarsinogen/karsinogen metabolizmasına olan etkilerini araştıran çalışmalar sınırlı sayıdadır (Barber et al 2001). İnsan karaciğer hücre kültüründe ise böyle bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Çeşitli alanlarda yaygın kullanımı, bazı ürünlerin yapısında bulunması, yüksek miktarda nişasta içeren gıdaların kızartılması sonucu kolayca oluşması, insanların sıklıkla maruz kaldıkları en önemli kimyasal maddelerden biri olması ve vücuttaki metabolizması sonucu oluşan metabolitinin nörotoksik, reproduktif toksik ve karsinogenik özellikleri akrilamidi insan sağlığı açısından önemli yapmaktadır. Önerilen bu çalışmada, akrilamidin P450'ye bağımlı ilaçları metabolize eden enzimlerin CYP1A1-1A2, CYP2E1 ve CYP3A4 izozimleri üzerine olan etkisinin insan karaciğer hücre dizisinde (HepG2) aydınlatılması amaçlandı.

2. MATERYAL ve METOT

Hücre Kültürü

Çalışma boyunca kullanılmış olan insan karaciğer kanser hücreleri (HepG2). European Collection of Cell Cultures (ECACC)'tan satın alınmıştır. 80°C'de DMSO'da saklanan hücreler 37 °C'de eriyene kadar bekletildi, eridikten sonra flaska hücreler ekildi ve üzerine 9 ml Dulbecco's modified Eagle besi ortamı (DMEM) eklenerek 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda 1 gün inkübe edildi. Ertesi gün DMSO'dan kurtarmak için besiyeri değiştirildi ve CO₂ inkübatöründe hücreler deney için yeterli stok sayısına ulaşıncaya kadar yukarıda belirtilen şartlarda inkübe edildiler.

Sitotoksitite Deneyi

Büyütülen hücreler 96 kuyulu plakalara ekmek için tripsin ile kaldırıldı. 15 ml'lik steril Falcon tüplere besiyeri içinde olan hücreler alındı. 1500 rpm de 24 °C de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp, dibe çöken hücreler 2 ml besiyeri içinde çözüldü. 20µl hücre, 20µl Tripan blue (1:1000 sulandırılmış) ile boyandı ve Thoma lamı kullanılarak hücreler sayıldı, her kuyucukta 1×10^3 hücre olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekildi ve plakaların üzeri toplamda 200 µl olacak şekilde besiyeri ile tamamlandı ve 24 saat hücrelerin plakaya yapışması için %5 lik CO₂ inkübatöründe bekletildi. Değişik akrilamid konsantrasyonları 0.5 Mm; 1.25 mM; 2.5mM; 5mM; 10mM; 20mM; 25mM ve 50mM olacak şekilde değişik kuyucuklarda ayarlandı. Kontrol grubuna ise sadece besi ortamı eklendi. Tüm kuyucuklar 200 µl'ye besiyeri ile tamamlandı. 48 saat sonunda besiyerleri plakadan uzaklaştırıldı. Her kuyucuk 100 µl kristal viyole ile boyanıp 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Plaka çeşme altında tutularak boya uzaklaştırdı. Her kuyucuğa 100 µl 0,1 M %50 etanol içindeki Na-Sitrat eklendi ve 15 dakika 100 rpm de çalkalandı. Oluşan renk 630nm de plaka okuyucuda ölçüldü.

Bişinşonik Asit ile Protein Tayini

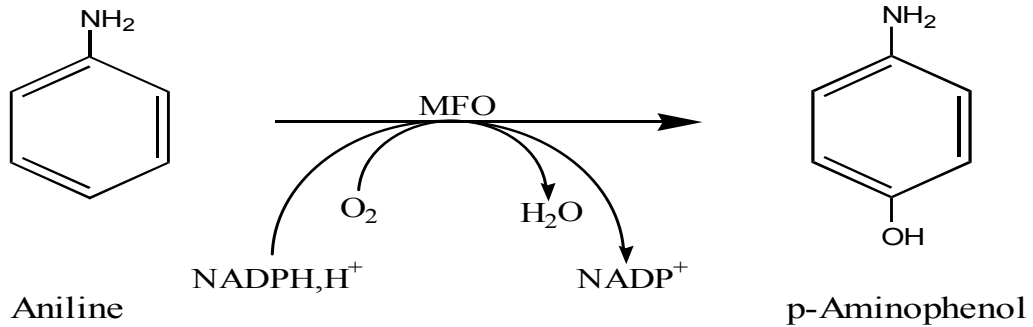
Protein tayini için gerekli olan Bişinşonik Asit solüsyonu (BCA) **Micro BCA Reaktif A** (8 gr sodyum karbonat monohidrat ve 1,6 gr sodyum potasyum tartarat suda çözülür. pH 11,25'e 10 N sodyum bikarbonat ile titre edilir. Son hacim 100

mL'ye tamamlanır), **Micro BCA Reaktif B** (4 gr BCA tartılarak 100 mL ultrasaf suda çözülür) ve **Micro BCA Reaktif C** (0,4 gr bakır sülfat tartılarak 100 ml'de çözülür) 25:1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı. 96 kuyucuklu plakalara 0,1 ml seyreltilmiş örnek (10X -25X) veya Standard protein solüsyonu (Sığır serum albumin) ve 0,1 ml BCA solüsyonu eklenerek karıştırıldı. 15' 60⁰C'de inkübe edildi ve 590nm'de Eliza okuyucuda ölçüldü.

Akrilamidin Ksenobiyotik Metabolizmasında rol oynayan P450 enzim aktiviteleri üzerine Etkilerinin Tayini

Anilin 4-Hidroksilaz Tayini (CYP2E1)

Hazırlanan hücre homojenatlarında anilin 4-hidroksilaz aktivitesi anilin substratı kullanılarak Imai ve ark. (1996) tarafından önerilen metotla tespit edildi. Bu metot mikrozomal aniline 4-hidroksilaz enzimi ile anilin'in konjügasyonu sonucunda oluşan p-aminofenol'ün (pAP) ışığı 630 nm'de absorplamasına dayanmaktadır (Şekil 2.1.)



Şekil 2.1. Anilin 4-Hidroksilaz enzimatik reaksiyonu

Tipik reaksiyon ortamı 100 mM HEPES tamponu, pH 7,6, 10 mM anilin, uygun miktar hücre homojenatı ve 0,5 mM NADPH generating sistemi içermektedir (Tablo2.1). NADPH generating sistemi test tüpüne 0,5 ünite glikoz 6-fosfat dehidrogenaz, 2,5 mM glikoz 6-fosfat, 2,5 mM MgCl₂, 14,6 mM HEPES tamponu, pH 7,8 ve 0,5 mM NADP⁺ eklenmesiyle hazırlanır. Daha sonra generating sistem içeren test tüpü 37⁰C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra kullanılına kadar buz üzerinde muhafaza edilir.

Tablo 2.1. HepG2 hücreleri için Anilin 4-hidroksilaz ölçüm karışımının içeriği.

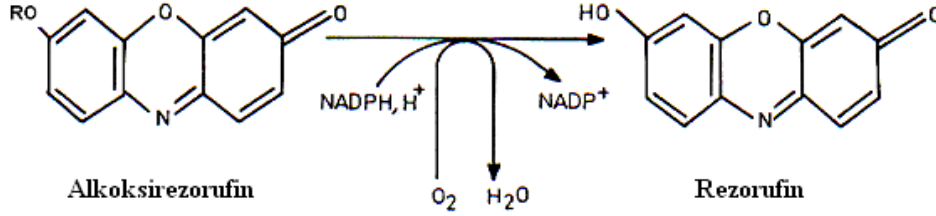
Stok Solüsyonlar	Eklenen Hacim(ml)	Son Konsantrasyon
400 M HEPES tamponu pH 7,6	0,125	100 mM
100 mM Anilin	0,050	10 mM
Homojenat	-	1 mg/ml
NADPH generating sistem		
100 mM Glikoz 6-P	0,025	2,5 mM
100 mM MgCl ₂	0,025	2,5 Mm
200mM Hepes tamponu pH 7,8	0,073	14,6 Mm
20 mM NADP ⁺	0,025	0,5 Mm
500 u G6-PD	0,001	0,5 U
Distile su	0,5ml'ye tamamla	
Toplam Hacim	0,5 ml	

Yukarıdaki tabloya göre tüplere tüm bileşenler eklenir ve reaksiyon 0,075 ml NADPH generating sistemin eklenmesiyle 37 °C' deki çalkalamalı su banyosunda başlatılır. 37°C'de, 75 dakika çalkalamalı su banyosunda bekletildikten sonra tüplere 0,25 ml %20 TCA eklenerek reaksiyon durdurulur. Sıfırıncı zaman körü denilen tüplere reaksiyonu sıfırlamak için NADPH generating sistem eklemeyen önce 0,250 ml %20 TCA eklenir. Tüplerdeki karışım eppendorf tüplerine alınarak 4 °C de 16000xg de 25 dakika santrifüj edilir. Santrifüjden sonra 0,5 ml süpernatant alınır ve üzerine 0,25 ml %20 Na₂CO₃ eklenir. Ardından 0,4 N NaOH içeren %20 fenol eklenerek renklendirilir. Renk oluşumu için 30 dakika 37 °C'de sıcaklıkta inkübasyonun ardından 630 nm'de spektrofotometrik olarak köre karşı ölçülür. Enzim aktivitesi, elde edilen absorbans ve değişik konsantrasyonlarda *p*-aminofenol kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplandı.

Alkoksirezorufin O-Dealkilaz (AROD) Aktiviteleri Tayini (CYP1A1 ve CYP1A2)

Hücre homojenatlarında AROD aktiviteleri Burke ve Mayer (1974) metodu ile tespit edildi ayrıca Arınç ve Şen (1994) tarafından optimize edilen şartlar kullanıldı (Şekil 2.2). Bu aktivite tayinlerinde substrat olarak 7-etoksirezorufin (CYP1A1), 7-

metoksirezorufin (CYP1A1, CYP1A2) kullanıldı. Her bir substrat (7-etoksirezorufin, 7-metoksirezorufin) için enzim aktiviteleri sırasıyla; etoksirezorufin O-deetilaz (EROD), metoksirezorufin O-demetilaz (MROD) olarak isimlendirilmektedir.



Şekil 2.2.. Alkoksirezorufin dealkilasyonu

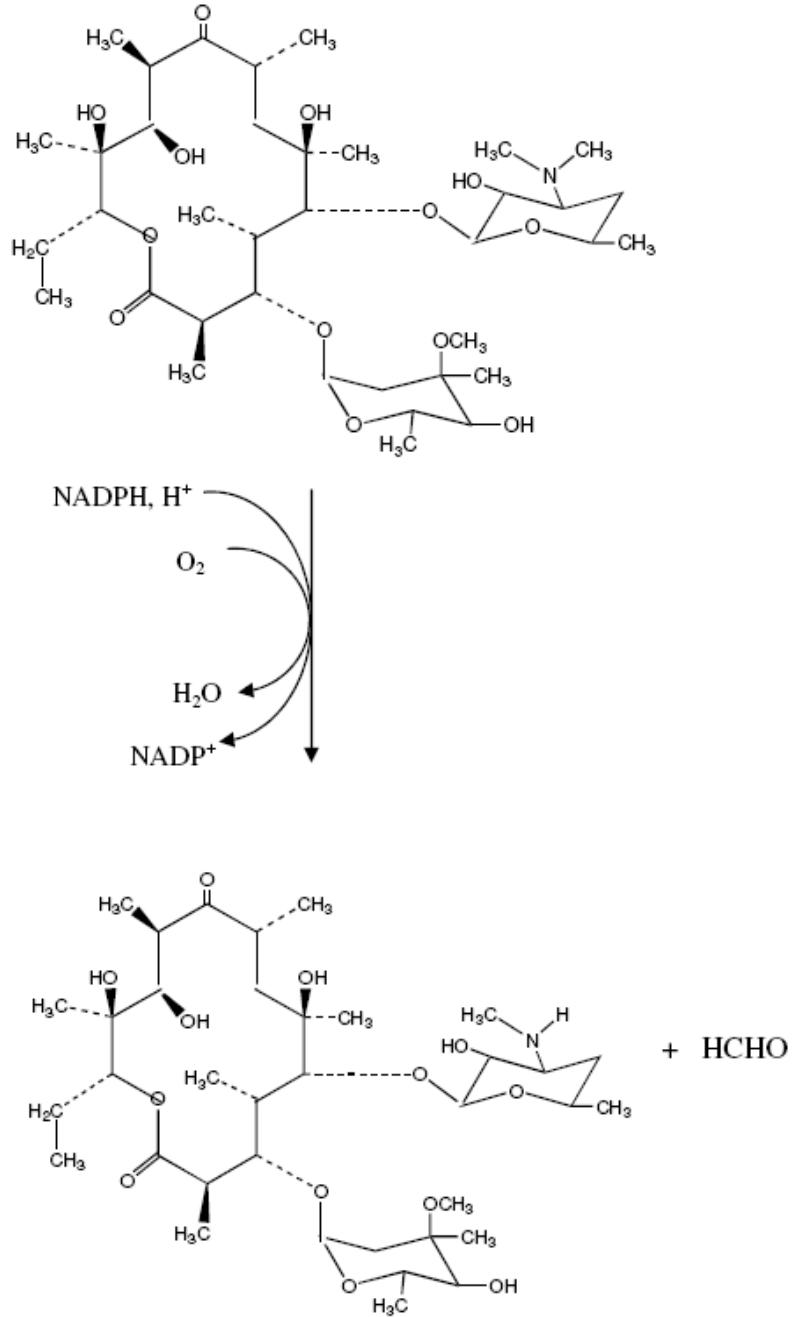
Buna göre tipik reaksiyon ortamı 100 mM potasyum fosfat tamponu pH 7,80, 100 mM NaCl, 1,2 mg BSA, belirli miktarda protein ve 1,5 μM 7-Etoksirezorufin veya 0,225 μM 7-metoksirezorufin substrat olarak ve ve 0,1 M NADPH içermektedir (Tablo2.2). Reaksiyon çözeltisinin tablo 2.2' de verilen stok çözeltilerden florometre küvetinde reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son substrat ilave edilerek başlatıldı ve reaksiyon Cary Eclipse (Varian) Florometre'de 6 dakika boyunca takip edilir. Son olarak, reaksiyon karışımına iç standart olarak resorufinin bilinen miktarı eklendi ve floresans'taki artış kaydedildi. Enzim aktiviteleri, resorufin eklenmesinin neden olduğu floresans artış kullanılarak hesaplanır.

Tablo 2.2 HepG2 hücreleri için EROD ve MROD ölçüm karışımın içeriği

Stok	Kullanılan Miktar(μl)	Son Konsantrasyon
0,4 M KPi (Ph:7.8)	250	100 mM
1 M NaCl	100	100 mM
12 mg/ml BSA	100	1.2 mg/ml
Protein (0.5 mg/ml)	200	100 mg/ml
dH ₂ O	190	
10 mM NADPH	10	
10 mM 7-Etoksi resorufin	150	1.5 mM
30 mM 7-Metoksi resorufin	150	4,5mM

Eritromisin N-Demetilaz Aktivite Tayini (CYP3A4)

Hücre homejenatında Eritromisin N-demetilaz aktivitesi Cochin ve Axelrod (1959) tarafından önerilen yöntem ve Nash (1953) metoduna göre formaldehit miktarının ölçülmesiyle tespit edilmiştir (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Eritromisin N-demetilasyonu

Buna göre, tipik reaksiyon karışımı 50 mM HEPES tamponu (pH 7,8), 5 mM eritromisin, belirli miktarlarda protein ve 0,5 mM NADPH ve ultra saf su kullanılarak son hacim 0,5 mL olacak şekilde hazırlandı (Tablo2.3). NADPH'ın ortama eklenmesiyle reaksiyon başlatılır. İçinde mikrozomların yer aldığı sıfırıncı zaman körü denilen tüplere reaksiyonu sıfırlamak için NADPH eklemeyen önce 0.75 N'lik perklorik asit eklendi. İnkübasyon 37 °C de, 80 dakikada çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirilir. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyon tüplerine 0,75 N'lik perklorik asit eklenmesiyle sona erdirildi. Daha sonra karışım eppendorf tüplerine transfer edilerek 16 000 xg de 20 dakika santrifüj edildi. Sonuçta, süpernatant yeni tüplere transfer edilip Nash reaktifinden eklenerek renk oluşumu için 10 dakika 50 °C sıcaklıkta inkübasyonun ardından 412 nm'de spektrofotometrik olarak köre karşı ölçüldü. Standart olarak kullanılan formaldehitin farklı konsantrasyonları yardımı ile oluşturulan kalibrasyon grafiğinin eğiminden yararlanılarak aktiviteler hesaplandı.

Tablo 2.3: HepG2 hücreleri için Eritromisin N-demetilaz ölçüm karışımının içeriği.

Stokİçerik	Eklenen Hacim(ml)	Son Konsantrasyon
0.4 M HEPES tamponu, pH 7.80	0,125	50 mM
Mikrozomal protein		1 mg/ml
50 mM Eritromisin	0,010	5 mM
NADPH Generating Sistem*	0,075	
Distile Su	0.5 ml tamamlanır	
Toplam	0.5 ml	

*NADPH generating sistem Tablo 2.1'e göre hazırlanmıştır.

CYP450 İzozimlerinin Protein Ekspresyon Düzeyinin Tayini

SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS), varlığında Laemmli (1970) tarafından tanımlanmış olan kesintili bir tampon sisteminde %8,5 ayırma ve %4 sıkıştırma jellerinde yapılmıştır. Fermentas “PageRuler Prestained Protein Ladder” moleküler ağırlık standartları olarak kullanılmıştır.

Ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonları Tablo 2.4’te belirtildiği gibi verilen miktarların karıştırılması ile verilen sırayla kullanımdan hemen önce hazırlandı.

Tablo 2.4. SDS-PAGE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları

	Ayrıştırıcı Jel (%8,5) (0,375 M Tris, pH 8,80)	Sıkıştırıcı Jel (%4) (0,125 M Tris, pH 6,80)
Jel Çözültisi(ml)	8,5	1,5
Distile Su (ml)	13,55	5,88
Ayrıştırıcı Jel Tamponu (ml)	7,5	-
Sıkıştırıcı Jel Tamponu (ml)	-	2,5
%10 SDS (ml)	0,4	0,16
%10 APS (ml)	0,15	0,065
TEMED (ml)	0,015	0,012
Toplam Hacim	30	10

Poliakrilamid slab jelleri, jel sandviçinin hazırlanması ile The Emperor Penquin Water Cooled Dual Gel Electrophoresis System Model P9DS (Owl Separation Systems, Inc. Portsmouth, NH USA) elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. İlk önce jel sandviçi temiz ve düz bir zemin üzerinde önce uzun camın (14 x 16 cm), bunun üzerine 0,8 mm’lik teflon ayırıcılar ile sabitleyici plastik levhanın ve son olarak da kısa camın (12,5 x 16 cm) üst üste yerleştirilmesiyle oluşturuldu. Bunu, sandviçin sisteme oturtularak vidalarla sıkıştırılması ve sandviçin oturtulduğu tabandaki kuyucuğa %2’lik agaroz dökülerek sisteme sabitlenmesi izledi. Daha sonra ayrıştırıcı jel polimerizasyon solüsyonu Tablo 2.4’de belirtilen oranlarda hazırlanarak sandviç içindeki çözeltinin istenilen yüksekliğe (8–9 cm) ulaşmaya kadar 10 ml’lik bir pipet yardımı ile teflon ayırıcıların bir köşesinden jel sandviçin içine doğru transfer edildi. Ucu bükülmüş iğneli bir şırınga kullanılarak, düz bir jel yüzey oluşumunu sağlamak için nazikçe boşlukların bir köşesinden fışkırtılmak suretiyle jel polimerizasyon

solüsyonunun yüzeyi yaklaşık 0,1 cm kalınlığında bir izopropil alkol tabakasıyla kaplandı. Jel sonradan oda sıcaklığında 15–20 dak süreyle polimerizasyona bırakıldı. Polimerizasyondan sonra alkol tabakası tamamen boşaltıldı ve hazırlanan sıkıştırıcı jel polimerizasyon solüsyonu 5 ml'lik pipet kullanılarak sandviç tamamen dolana kadar bir teflon ayırıcının köşesinden jel sandviçinin içine döküldü. Sıkıştırıcı jel eklendikten sonra 15 tane diş içeren 0,8 mm'lik teflon tarak, tarağın dişi içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde sıkıştırıcı jel polimerizasyon solüsyonu katmanına yerleştirildi. Polimerizasyon oda sıcaklığında yaklaşık 30 dak'da tamamlandı.

SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile Analiz edilecek proteinlerden alınan bir örnek 4X numune seyreltme tamponu ile 3:1 oranında (3 kısım örnek ve 1 kısım tampon) seyreltildi ve sıcak su banyosunda 2 dakika süre ile kaynar suda kaynatıldı. Teflon tarak dişleri yırtmadan dikkatlice sıkıştırıcı jelden çıkarıldı. Kuyucuklar eğer varsa herhangi bir hava kabarcığını uzaklaştırmak için ince iğneye sahip bir şırınga kullanılarak elektrot tamponu ile dolduruldu. Daha sonra blok alt ve üst rezervuarları elektrot tamponu ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi. Uygun iğneli bir Hamilton şiringası kullanılarak 40 µl (200 µg hücre lizatları) protein örneklerinden ve 10 µl moleküler ağırlık standartlarından kuyucukların tabanında ince bir katman olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.

Sistem Thermo EC 1000–90 (100 Colin Drive Holbrook, NY 11741–4306, USA) güç kaynağına bağlandı. Sisteme aynı anda iki jel sandviçi hazırlanarak aynı anda iki elektroforetik ayırıştırma yapıldı. Elektroforetik ayırıştırmanın yapılacağı iki jel için sıkıştırıcı jel üzerinde 20 mA'lık sabit akım yürütme işlemi yapıldı. Yol gösterici boya ayırıştırıcı jele ulaştığında akım 30 mA'e sıkıştırıcı jelden çıktığında ise 40 mA'e çıkarıldı (Eğer tek jel kullanılarak elektroforetik ayırıştırma yapılacaksa mA değerleri yarılandı). Elektroforetik ayırıştırma süresince ısınmayı engellemek için sisteme 5°C'ye ayarlanmış Nüve (Nüve Cooling Bath Type BS 302 (S) Esenboğa Yolu 22 km Akyurt 06287 Ankara-Türkiye) Soğutmalı Su Banyosu bağlandı. Yol gösterici boya tabana ulaşacağı zaman (ayırıştırıcı jelin başlangıcından yaklaşık 6-7 cm) güç kaynağı kapatıldı. İyi bir ayırıştırma sağlamak için toplam 5-5,5 saat yürütme yapıldı.

Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel bloğu aparattan alındı ve iliştilmiş jel sandviç çıkarılarak kısa cam tabaka dikkatlice açıldı. Jel yol gösterici boyanın olduğu yerden, kenarlardan, sıkıştırıcı jel bitiminden kesildi ve üstten sol köşesi (1 numaralı kuyucuk) kuyucukların sıralarını belirlemek için işaretlendi. Jel uzun cam tabakadan dikkatlice alındı ve oda sıcaklığında 45 dak süreyle %0,2 Coomassie Pirlanta Mavis R 250, %50 metanol ve %12 glacial asetik asit içeren boya çözeltisiyle bir karıştırıcı kullanarak hem boyandı hem de sabitlendi. Uygun bir süre (en azından 24 saat) bağlanmayan çözünmüş boyanın uzaklaştırılması için %7'lik asetik asit içeren %30'luk metanol çözeltisi ile inkübe edildi (bu süre zarfında solüsyon birkaç kez

değiştirildi). Sonuç olarak, jellerden bazıları fotoğraflandı ve boyası çıkarılmış jeller %7'lik asetik asit çözeltisi içinde saklandı.

Western Blot Analizleri

Western blot prosedürü Khyse-Anderson (1984) ile Tovey ve Baldo (1987) tarafından tanımlandığı gibi uygulanmıştır. Ancak bizim laboratuvar koşullarımıza göre optimize edilmiştir.

Yukarıdaki bölümlerde tanımlandığı gibi denatüre koşullar altında %4'lük sıkıştırıcı ve %8,5'lük ayrıştırıcı jeller içinde elektroforez edildi. Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel bloğu aparattan alındı ve iştirilmiş jel sandviç çıkarılarak kısa cam tabaka dikkatlice açıldı. Jel yol gösterici boyanın olduğu yerden, kenarlardan, sıkıştırıcı jel bitiminden kesildi ve üstten sol köşesi (1 numaralı kuyucuk) kuyucukların sıralarını belirlemek için işaretlendi. Sonra, jeller transfer tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin ve %10 metanol) içersinde 10 dakika süreyle sabit hızlı bir çalkalayıcıda inkübasyona bırakılarak ön dengeleme yapıldı.

Elektroforetik transfer iBlot Dry Transfer" (Invitrogen Corporation 1600 Faraday Avenue, PO Box 6482, Carlsbad, California 92008 USA) kullanılarak kuru Western blot yöntemi uygulanarak yapıldı. iBlot cihazın kapağı açıldı. Üzerinde naylon membranıda hazır olan Anot Transfer Yığınının kabı açılıp plastik küvetiyle beraber cihaza kondu. Jel membranın üzerine dikkatlice ve hava kabarcığı olmayacak şekilde yerleştirildi. Üzerine sistemden çıkan ve distile su ile ıslatılmış olan filtre kağıdı kondu. Üzerinden röle yurgu ile yurgulanarak hava kabarcıkları çıkarıldı. Katot Transfer Yığını açılarak filtre kağıdının üzerine konuldu. Tekrar önceki gibi yurgulandı. Sistemin süngeri cihazın üst kapağına yerleştirilerek kapak kapatıldı. Cihazdan P2-12 dak programı seçildi ve "start" tuşuna basılarak transfer başlatıldı. Süre sonunda cihaz kapatıldı, hücrenin bağlantısı kesildi ve cihazın kapağı açıldı; üstteki katot yığın, filtre kâğıdı ve jel dikkatlice alındı. Altta kalan membran dikkatlice TBST içine alındı. Bu sistem kısa, hızlı ve etkin bir transfer yöntemidir. Sonuç olarak üzerinde transfer edilmiş proteinleri barındıran membran, 'Blot', elde edildi.

Blot, protein içeren yüzeyi üste gelecek şekilde küçük plastik bir tepsinin içine yerleştirildi ve membran 1 saat süreyle bloke çözeltisi (TBST içinde yağsız %5'lik süt tozu) ile çalkalayıcı da inkübe edildi. Süre sonunda 1/200 ve 1/1000 arasında bloklama solüsyonu içinde dilue edilmiş anti-human CYP1A2, CYP2E1 ve CYP3A4 primer antikoları membranın üzerine boşaltıldı ve tüm gece inkübe edildi. Daha sonra membranın tamamen temizlenmesini sağlamak için TBST solüsyonunda her biri 5 dak olmak üzere 3 defa yıkandı. Membran daha sonra 1 saat süreyle işaretleyici enzim-alkali fosfataz (anti-rabbit IgG-HRP konjugatı) ile bağı olan ikinci

antikorlarla inkübe edildi. Membran önceden tarif edildiği gibi tekrar yıkandı. Son olarak membran, antikor bağlanan proteinlerin tespiti için Ey ve Ashman (1986) tarafından tanımlanan substrat çözeltisi (Tris-HCl, pH 8,80, NaCl, MgCl₂, ZnCl₂, Dietanolamin, Nitroblue tetrazolyum, fenazin metasülfat ve bromokloroindoylfosfat) ile inkübe edildi. Görüntü elde edildikten sonra blot havada kurutuldu, stretch film ile kaplandı ve karanlıkta saklandı. Oluşan protein bantlarının densitometrik analizleri Scion Image Analyzer yazılımı ile belirlenip, CYP450 izozimlerinin protein seviyesinin akrilamid sonucu nasıl değiştiği belirlendi.

CYP450 İzozimlerinin mRNA Ekspresyon Düzey Tayini

Hücre Hattında Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu TRIzol® solüsyonu kullanılarak üretici firmanın önerdiği talimatlarına göre gerçekleştirildi ancak kendi laboratuvar koşullarımız için optimize ettiğimiz prosedür uygulandı. Buna göre kontrol ve akrilamid ile muamele edilmiş yaklaşık 1×10^6 hücre 0,3 ml parçalama tamponu (Tablo 2.5.) ile toplandıktan sonra 18G uçlu steril iğne ile 10 defa çekip bırakılarak bu tampon içinde homojenize edildi. Daha sonra bu patlatılmış hücreler yeni bir eppendorf tüpüne alınıp üzerlerine 600 µl TRIzol® solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında düşük hızda karıştırıldı. Ardından 100 µl Kloroform eklenerek 1 dakika yüksek hızda karıştırıldı. 5 dak oda sıcaklığında ve 5 dak buzda inkübe edildikten sonra 13 000 rpm'de 15 dak santrifüj edildi. RNA içeren supernatant yeni steril eppendorfa alındı. Bu işlem sırasında DNA içeren orta faza dokunulmamaya dikkat edildi. Alınan supernatanta eşit hacimde soğuk saf isoprapanol eklenip oda sıcaklığında 10 dak inkübe edildi. Daha sonra tüpler 13 000 rpm'de, 4 °C 'de 5 dak santrifüj edildi. Pelet üzerine 1000 µl %75'lik soğuk etanol eklendi ve oluşan pelet dağıtıldı. 7 500 rpm'de, 4 °C 'de 5 dak santrifüj'den sonra RNA içeren pelet alev çatısı altında kurutuldu ve 75 µl RNAase free su içinde çözülerek -80 °C muhafaza edildi. İzole edilen RNA kalitesi 1% agoroz jel elektroforezinde 18S ve 28S bantlarının durumuna göre belirlendi. Elde edilen RNA'ların 260/280nm ölçümü ile miktarı belirlenerek cDNA sentezi sırasında 5 µg RNA kullanılması sağlandı.

Tablo 2.5. Parçalama tamponu çözeltileri

Stok Çözeltiler	Eklenen Hacim (ml)	Son Konsantrasyon
0.4 M KPi Tamponu pH 7.8	2.5	0.1 M
%10 Triton X-100	0.2	% 0.2
100 mM EDTA	0.2	2 mM
DDT	0.0015 gr	1 mM
100 mM PMSF	0.05	0.5 mM
100 mM ϵ -ACA	0.03	0.3 mM
Ultra Pure Su	10 ml tamamlanır	-
Toplam	10 ml	

cDNA sentezi

Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi 18 nükleotid uzunluğunda oligo d(T) primeri ve Moloney-Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptazı (MBI Fermentas, USA) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre sentezlendi. cDNA sentezi için 5 μ g toplam RNA ve 0,5 μ g (1 μ l from 500 μ g/ml stoktan) oligo (dT) primeri karıştırıldı ve son hacmi 11 μ l RNAase-free su ile tamamlandı. Karışım 70 °C 'de 5 dak inkübe edildikten sonra, üzerine 4 μ l, 5X reaksiyon tamponu (250mM Tris-HCl pH 8,3 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂ and 50 mM DDT) ve 2 μ l dNTP karışımı eklendi. 5 dak, 37°C'de inkübasyondan sonra 50 ünite Moloney-Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptazı eklenerek son hacim 20 μ l tamamlandı. Enzim eklendikten sonra, son karışım cDNA sentezi için ilk önce 42°C'de 1 saat inkübe edildi ve sonra enzim inhibe edilmek üzere 70°C'de 10 dak bekletildi. Sentezlenen cDNA'lar, RT-PZR yapmak üzere -20 °C muhafaza edildi.

Yarı Kuantifiye Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Akrilamidin CYP450 enzimlerin gen ifadeleri düzeylerine etkisini saptamak için mRNA düzeyleri RT-PCR yöntemi ile kantite edildi. Bu amaçla, GenBank/EMBL veri bankaları taranarak seçilen 4 adet CYP450 geni için uygun primer dizileri saptandı ve bu primerler sentezletti. Bu primerlerin nükleotid dizileri ve yapışma sıcaklıkları Tablo 2.6 verilmektedir.

Tablo 2.6. Seçilen CYP450 Genleri için tanımlanan primer dizileri ve yapışma sıcaklıkları

Primer Adı*	Primer Dizisi(5'→3')	Yapışma Sıcaklığı (°C)
hCYP1A1F	AGC GGA AGT GTA TCG GTG AGA	58,4
hCYP1A1R	CTG AAT TCC ACC CGT TGC A	
hCYP1A2F	ACT TCG ACC CTT ACA ATC AG	53,3
hCYP1A2R	CAC TGT TCT TGT CAA AGT CC	
hCYP2E1F	GCATCT CTT GCC TAT CCT T	61
hCYP2E1R	ATGGACCTACCTGGAAGGACAT	
hCYP3A4F	GCC TGG TGC TCC TCT ATC TA	54,7
hCYP3A4R	GGC TGT TGA CCA TCA TAA AAG	
H18SF**	CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA	58,4
h18S R**	GCT GGA ATT ACC GCG GCT	
* Primer adı CYP izoformunu tanımlamakta F(forward) R(reverse) primerleri simgelemektedir.		
**Kontrol amaçlı kullanılacak 18S primerleri		

RT-PZR protokolü tablo 2.7 'de verilmektedir. Reaksiyon ortamı bu tabloya göre hazırlandıktan sonra PZR tüpleri Techne TC 512 termal döngü cihazına yerleştirilmiş ve uygun döngü şartları kullanılarak PZR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm genler için PCR döngüsü aşağıdaki gibidir:

Ön Denatürasyon

1 döngü: 94 °C 5dakika.

PCR Döngüsü

32-35 döngü: 94 °C 45 saniye (Denatürasyon)
53,3-61 °C 1 dakika (Yapışma) (Tablo 2.6)
72 °C 1 dakika (Uzama)

Final Uzama

1 döngü: 72 °C 5 dakika

PCR ürününün 5 µl'si % 1,5'luk agaroz jelde yürütüldü ve UV ışığı altında EtBr boyamayla bantlar gözlemlendi. Bantların densitometrik analizi Scion Image Analyzer yazılımı ile belirlendi. Her band'ın densitometrik analizi house-keeping gen olan 18S'in densitometrik analizi ile karşılaştırılarak CYP450 izozimlerinin mRNA seviyelerinin akrilamid sonucu nasıl değiştiği belirlendi.

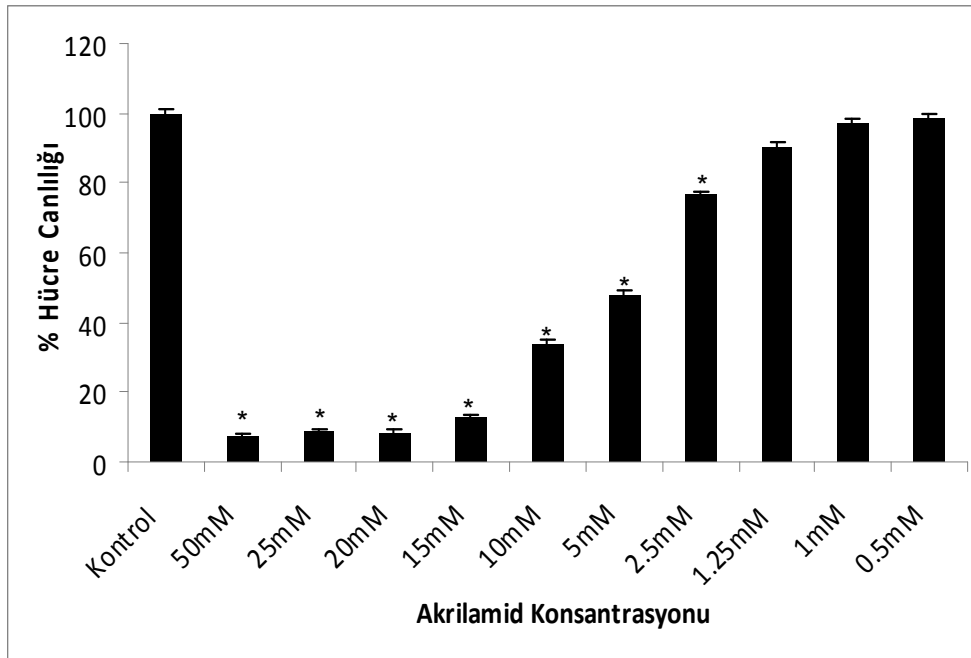
Tablo 2.7. RT-PZR Prosedürü

Bileşenler	Hacim (µl)
10X reaksiyon tamponu	2(µl)
MgCl ₂ (25mM)	3(µl)
İleri Primer (F) (10µM)	1(µl)
Geri Primer (R) (10µM)	1(µl)
dNTP (10mM)	0.5(µl)
Taq polimeraz (2.5U/(µl))	0.5 (µl)
Ultra Saf Su	12(µl)

3. BULGULAR

Farklı Konsantrasyonlarda Akrilamidin Sitotoksik etkisi

Sitotoksosite testi için değişik konsantrasyonda akrilamid suda çözünerek 0,2 mikronluk filtrelerden geçirildi ve daha önce 96'lık plakaya (1×10^3 /kuyucuk) ekilen HepG2 hücre dizisi üzerine 48 saat süresince maruz bırakıldı. 48 saatin sonunda 96 kuyulu plakadaki hücreler üzerine kristal violet çözeltisi eklenerek hücrelerin yaşam oranları ELISA okuyucu kullanılarak ölçüldü. Hiç akrilamid ile muamele etmediğimiz kontrol grubu ile akrilamid ile muamele ettiğimiz grubu karşılaştırdığımızda değişik dozlardaki akrilamidin hücre canlılığına etkisi belirlendi (Şekil 3.1). Şekil 3.1'de görüldüğü gibi yüksek doz Akrilamid ile muamele edilen gruplarda hücre canlılığı düşük doz Akrilamid gruplarındaki hücrelerin canlılık oranlarına göre daha düşük bulundu. Buna göre 5-50 mM arası konsantrasyonlardaki akrilamid hücrelerin %50'sinden fazlasının ölüme yol açmıştır. Bu sitotoksosite sonuçlarına göre bundan sonra 1.25 mM, 2.5 mM ve 5 mM akrilamid kullanılmaya karar verildi. Fakat 5 mM akrilamid konsantrasyonunda hücrelerden RNA ve protein elde edilemediğinden Akrilamidin CYP450 izozimlerine olan etkisinin belirlenmesi için 1.25 mM ve 2.5 mM akrilamid kullanılmaya karar verildi.



Şekil 3.1. Değişik konsantrasyonlardaki akrilamidin hücre canlılığına etkisi. Veriler üç tekrarın ortalama değerleridir; Kontrol değeri 100% alınmıştır.* $p < 0.05$ kontrol değerinden farklı)

Akrilamidin CYP450 Enzim Aktivitelerine Etkileri

HepG2 hücrelerinde 1.25 mM ve 2.5 mM akrilamid konsantrasyonunda CYP1A'ya bağlı etoksirezorufin O-deetilaz (EROD) ve metoksirezorufin O-demetilaz (MROD), CYP2E1'e bağlı anilin 4-hidroksilaz (ANH) ve CYP3A4 bağlı Eritromisin N-demetilaz (END) aktiviteleri ölçüldü. Tüm sonuçlar tablo 3.1'de verilmektedir. Buna göre CYP1A'ya bağlı EROD aktivitesi 1.25 mM ve 2.5 mM akrilamid uygulaması sonucunda sırasıyla 7.4 ve 4.4 kat arttı ($p<0.05$). Benzer şekilde CYP1A2'ye bağlı MROD aktivitesi her iki konsantrasyonda sırasıyla 3.5 ve 2.5-kat arttı ($p<0.05$). Benzer şekilde CYP2E1'bağlı aniline 4-hidroksilaz aktivitesi 1.25 mM ve 2.5 mM akrilamid uygulanması sonucunda sırasıyla 1.8-ve 2.75 kat attı ($p<0.05$). Diğer taraftan, eritromisin N-demetilaz aktivitesinde her iki dozda da anlamlı bir değişim bulunamadı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. İki değişik konsantrasyonda akrilamid'in CYP1A1-1A2, CYP2E1 ve CYP3A4 bağlı enzim aktivitelerine olan etkisi

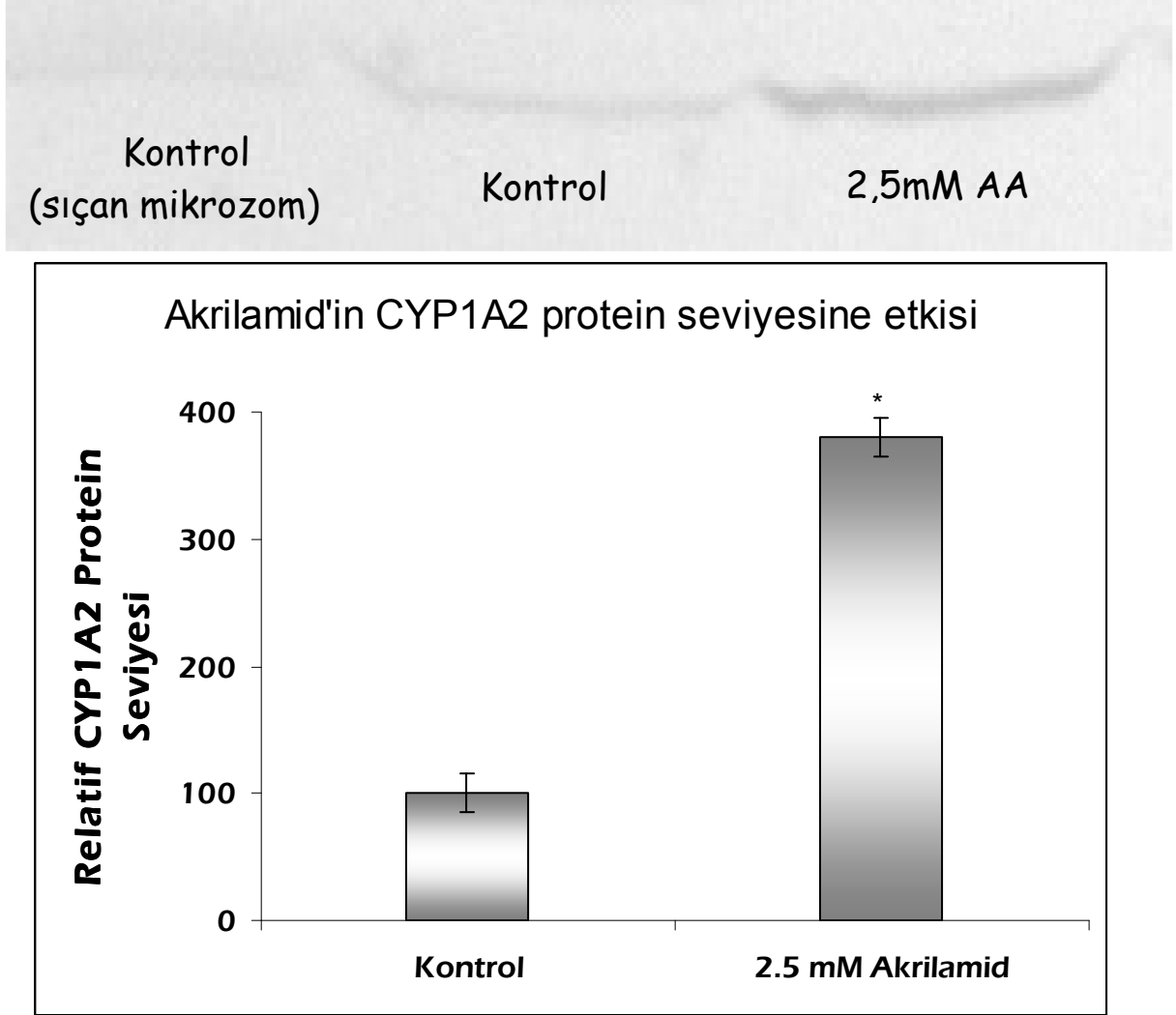
Aktivite	Kontrol	Değişim	1.25 mM Akrilamid	Değişim	2.5 mM Akrilamid	Değişim
EROD pmol/min/mg prot	0,28 ± 0,03	--	2,08 ± 0,1*	7.4 X ↑	1,24 ± 0,01*	4.4 X ↑
MROD pmol/min/mg prot	14,02 ± 0,09	--	48,5 ± 4,2*	3.5 X ↑	34,3 ± 1.0*	2.5 X ↑
ANH nmol/min/mg prot	0,12 ± 0,01	--	0,21 ± 0,005*	1.8 X ↑	0,34 ± 0,01*	2.8 X ↑
END nmol/min/mg prot	0,15 ± 0,015	--	0,1 ± 0,015	33 % ↓	0,13± 0,01	13 % ↓

Veriler 3 tekrarın ortalama ± SS değerleridir.

* Kontrol değerlerinden istatistiksel olarak farklı, $p<0.05$

CYP450 İzozimlerinin Protein Ekspresyon Düzeyinin Tayini

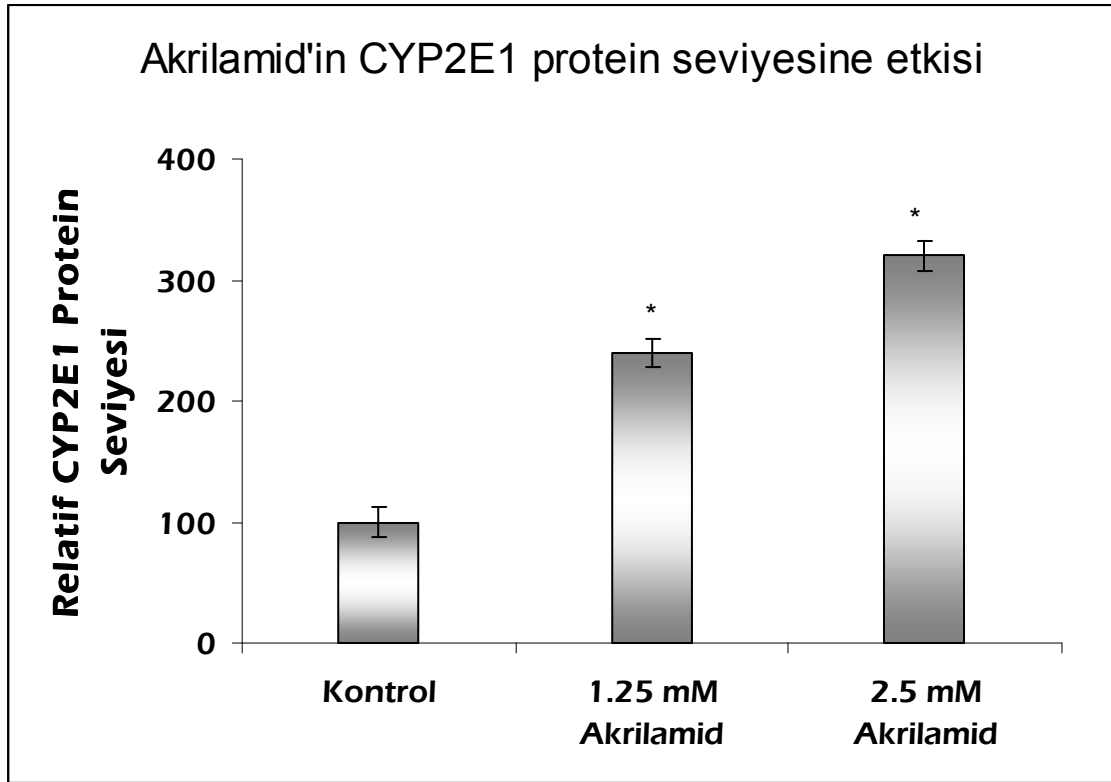
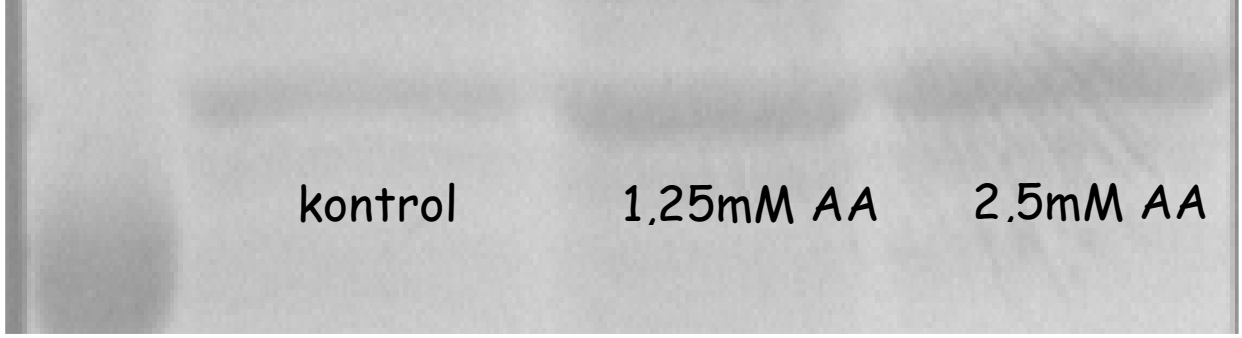
Akrilamid ile inkübe edilen hücreler ikiye bölünerek aynı zamanda ve aynı örneklerde protein ve mRNA ekspresyon düzeyleri de tayin edilmesi sağlandı. Akrilamidin CYP1A2 protein seviyesine olan etkisi Şekil 3.2’de verilmektedir. Protein bantlarının densitometrik analizi sonucunda CYP1A2 protein seviyesinin akrilamid uygulanması sonucunda yaklaşık 3.8-kat arttığı bulunmuştur.



Şekil 3.2. HepG2 hücrelerinde CYP1A2 ekspresyon düzeyi. Veriler üç kez tekrarlanan densitometrik analizin ortalama değerleridir; Kontrol değeri 100% alınmıştır.

* Kontrol değerlerinden istatistiksel olarak farklı, $p < 0.05$.

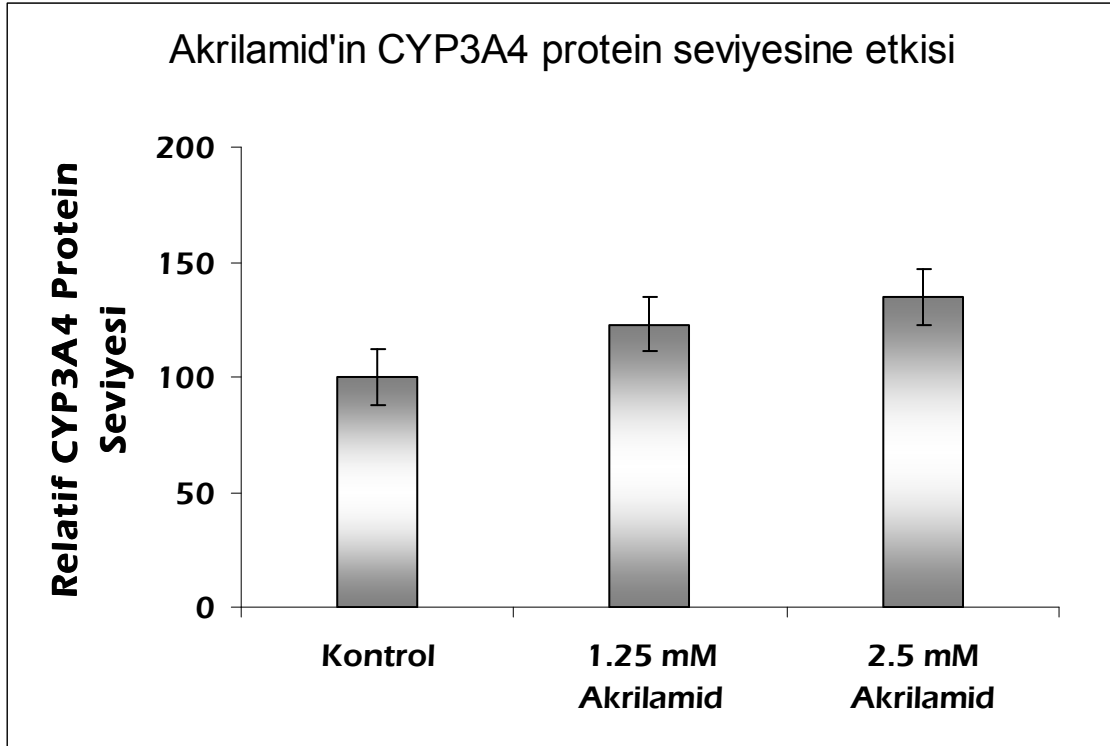
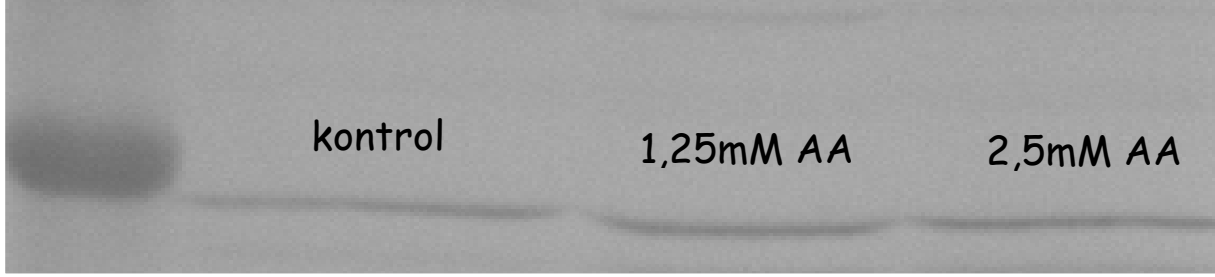
Benzer şekilde değişik konsantrasyonda akrilamid'in CYP2E1 protein seviyesi üzerine olan etkisi Western Blot analizi ile belirlendi (Şekil 3.3). Protein bantlarının densitometrik analiz sonuçlarına göre 1.25 mM akrilamid ve 2.5 mM akrilamid CYP2E1 protein seviyesinde sırasıyla yaklaşık 2.4- ve 3.2 kat artışa sebep oldu ($p < 0.05$).



Şekil 3.3. HepG2 hücrelerinde CYP2E1 ekspresyon düzeyi. Veriler üç kez tekrarlanan densitometrik analizin ortalama değerleridir; Kontrol değeri 100% alınmıştır.

* Kontrol değerlerinden istatistiksel olarak farklı, $p < 0.05$.

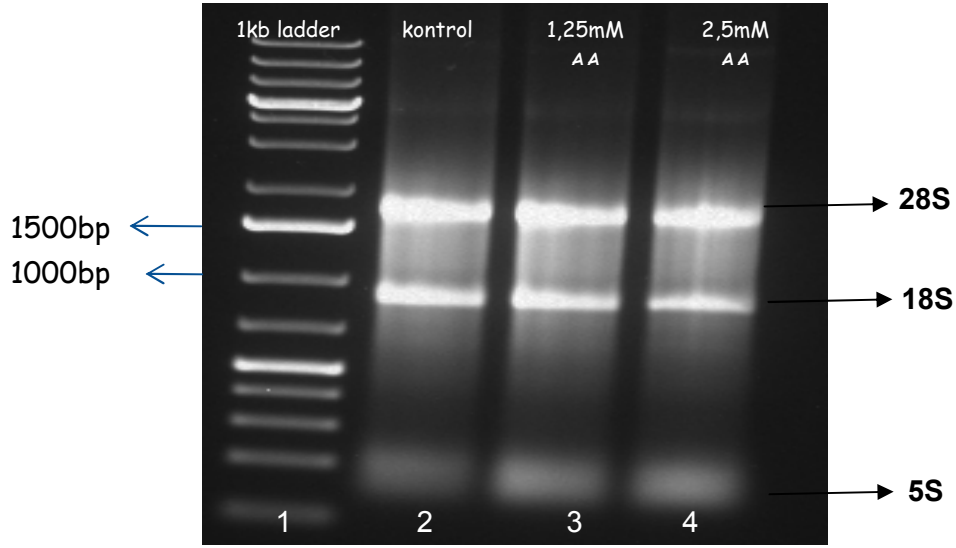
CYP1A2 ve CYP2E1'in aksine CYP3A4 protein seviyesinde akrilamidin her iki dozunda da anlamlı bir değişim bulunmamıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. HepG2 hücrelerinde CYP3A4 ekspresyon düzeyi. Veriler üç kez tekrarlanan densitometrik analizin ortalama değerleridir; Kontrol değeri 100% alınmıştır.

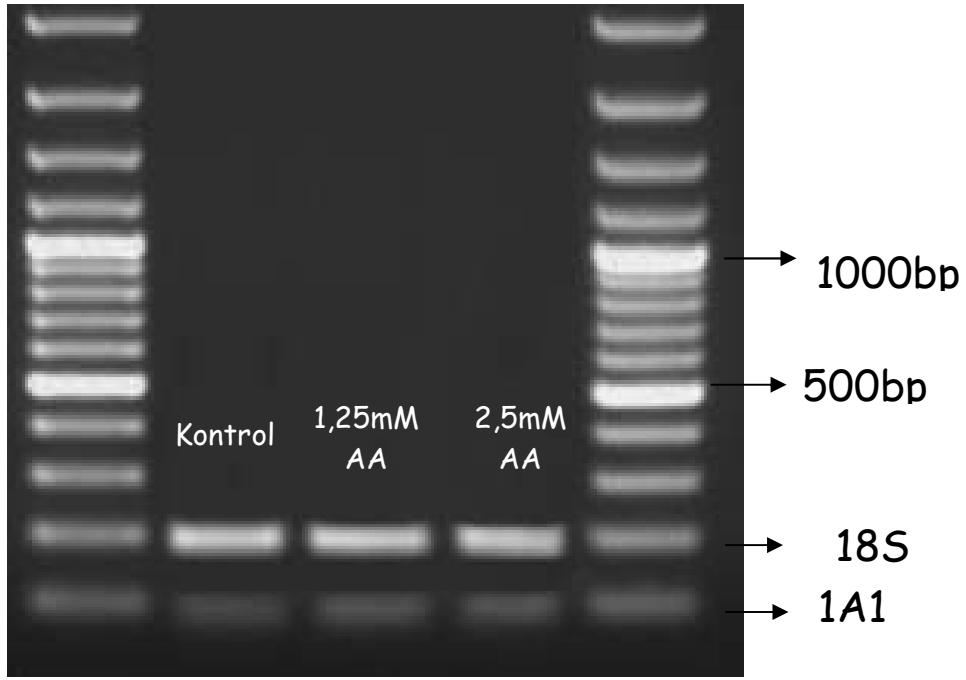
CYP450 İzozimlerinin mRNA Ekspresyon Düzey Tayini

Akrilamid'in sitotoksik etkisi saptandıktan sonra, 1.25 ve 2.5 mM konsantrasyonlarında akrilamid petrilere ekilmiş olan hücreler üzerine (1×10^6) steril olarak eklendi ve 24 saat sonra besi ortamı uzaklaştırıldı. Kontrol olarak akrilamid ile muamele edilmemiş hücreler kullanıldı. Toplanan hücrelerden trizol solüsyonu hazırlanarak total RNA izole edildi. Elde edilen RNA kalitesi agaroz jel elektroforezinde görüldüğü gibi iyi bulundu (Şekil 3.5).

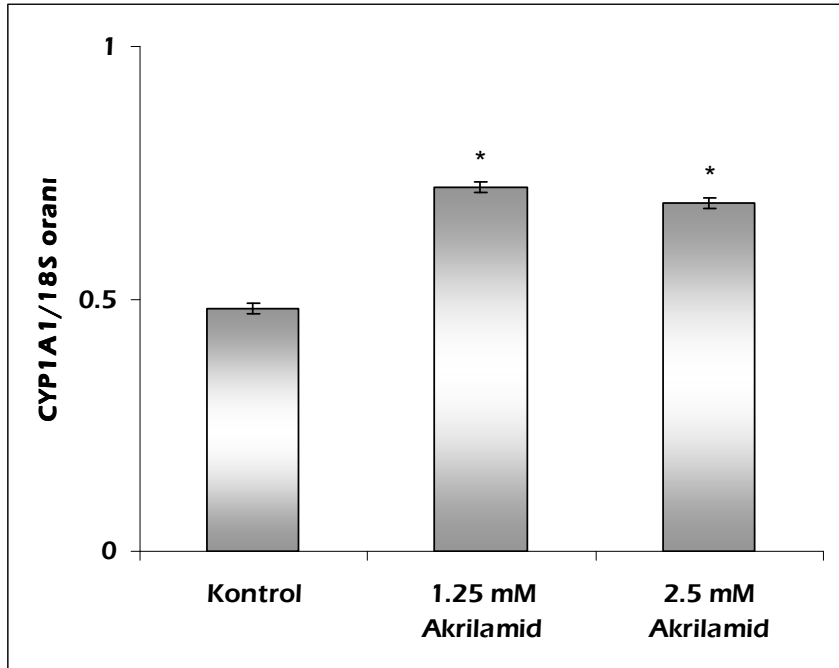


Şekil 3.5. İzole edilen RNA'ların 1%'lik agaroz jel elektroforezi. Hat 1: GeneRuler™ 1kb bp DNA Marker; Hat 2: Kontrol HEPG2; Hat 3: 1.25 mM akrilamid; Hat 4: 2.5 mM akrilamid.

İzole edilen RNA'ların konsantrasyonu ölçüldü ve belirli miktar alınarak akrilamidin CYP450 mRNA seviyelerine olan etkilerine RT-PZR ile bakılmaya başlandı. Bu amaçla ilk önce CYP1A1 çalışılmaya başlandı. RT-PZR işleminde CYP1A1 için kullanılacak yapışma sıcaklığı ve döngü sayısı optimize edildikten sonra akrilamidin CYP1A1 mRNA seviyesine olan etkilerine 35 döngü ve 58.4 °C yapışma sıcaklığı kullanılarak bakıldı. Buna göre 1.25 ve 2.5 mM akrilamid CYP1A1 mRNA seviyesinin sırasıyla 1.5 ve 1.45- kez artmasına neden oldu. (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7).

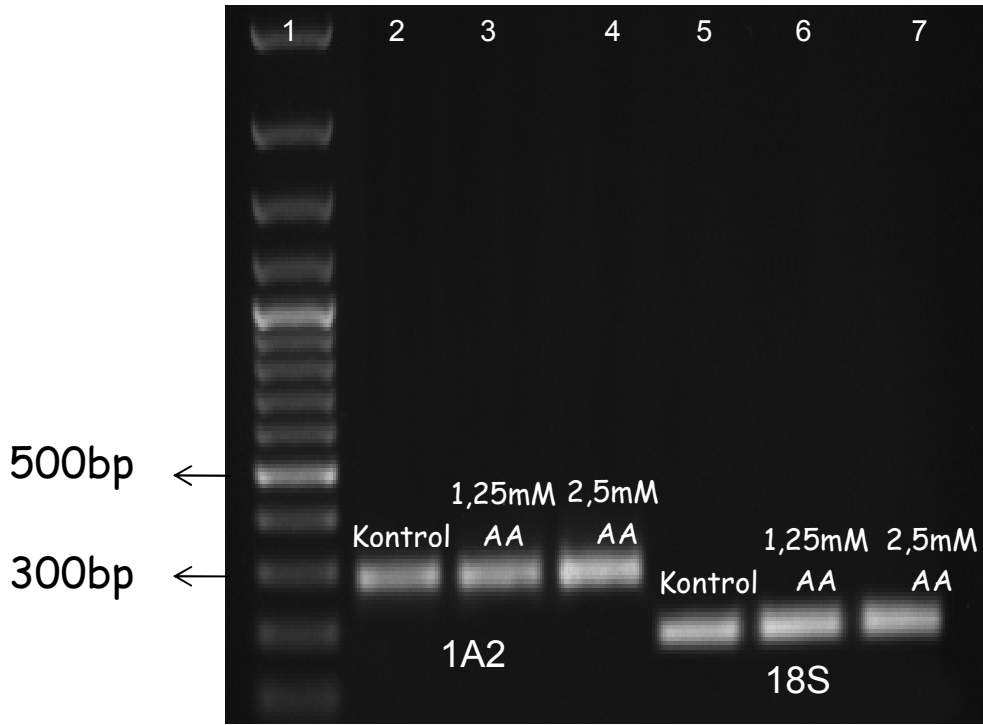


Şekil 3.6. Akrilamidin İnsan Karaciğer Hücre hattında CYP1A1 mRNA seviyesine olan etkisi. Internal kontrol olarak 18S rRNA geni kullanıldı. PZR ürünleri (10 µl) %1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntüledi. CYP1A1 ve 18S ürün bantlarının densitometrik analizi yapılmıştır.

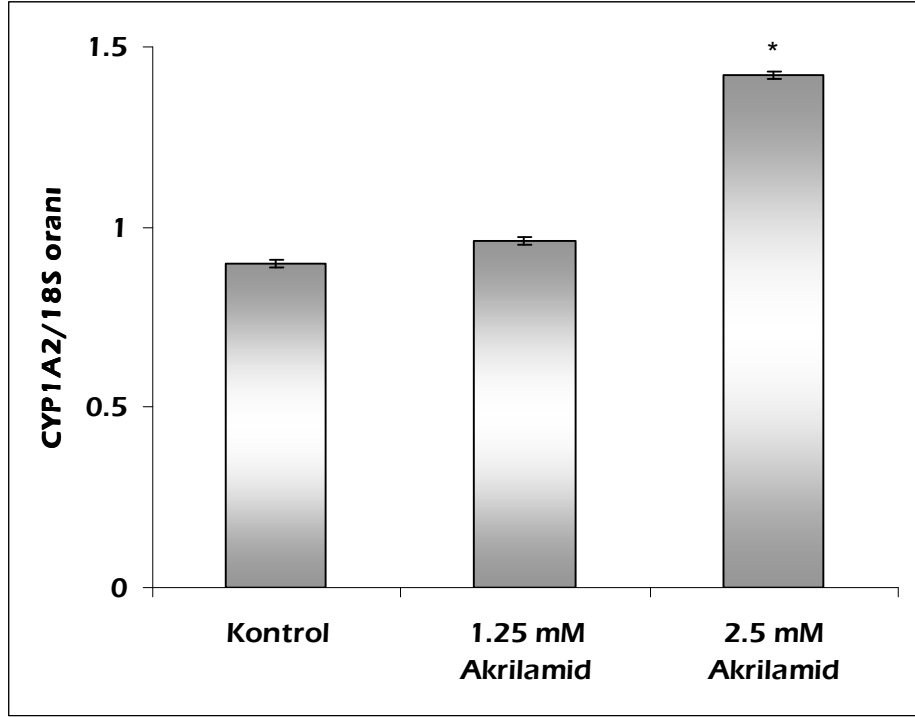


Şekil 3.7. Akrilamidin İnsan Karaciğer Hücre hattında CYP1A1 mRNA seviyesine olan etkisi. PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi ve 18S ile normalize edildi. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.005$).

Benzer şekilde CYP1A2 mRNA seviyesinin akrilamid sonucu nasıl etkilendiği çalışmada belirlendi. RT-PZR işleminde CYP1A1 için kullanılacak yapışma sıcaklığı ve döngü sayısı optimize edildikten sonra akrilamidin CYP1A2 mRNA seviyesine olan etkilerine 35 döngü ve 53.3 °C yapışma sıcaklığı kullanılarak bakıldı. Buna göre 1.25 mM akrilamid, CYP1A2 mRNA seviyesinde herhangi bir değişikliğe yol açmaz iken 2.5 mM akrilamid istatistiksel olarak anlamlı 1.47- kat artmasına neden oldu. (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9).



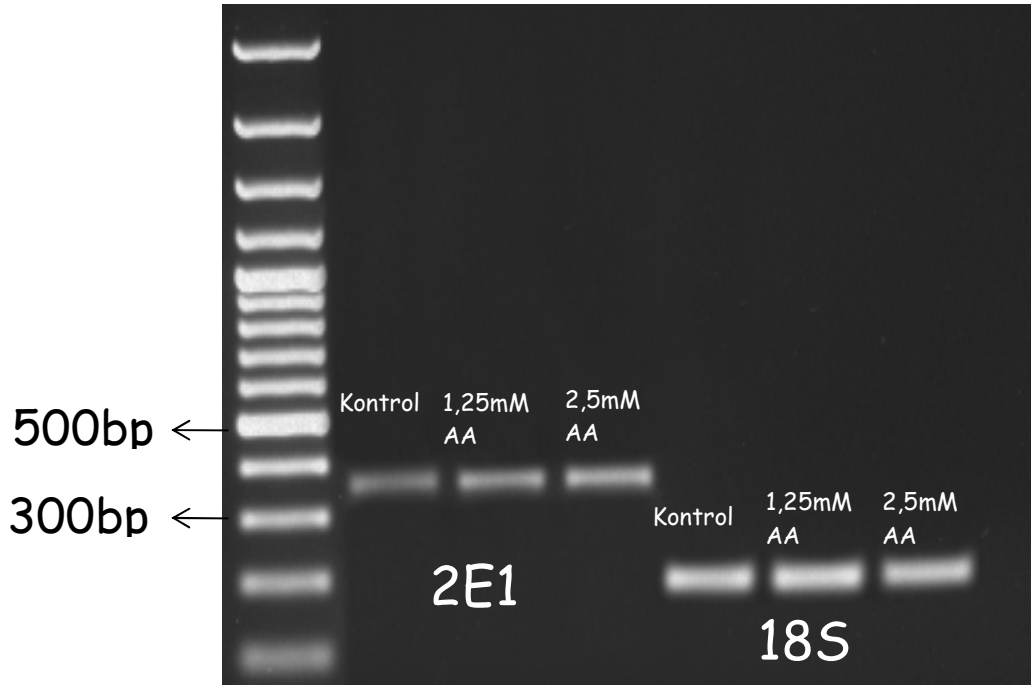
Şekil 3.8. Akrilamidin İnsan Karaciğer Hücre hattında CYP1A2 mRNA seviyesine olan etkisi. Internal kontrol olarak 18S rRNA geni kullanıldı. PZR ürünleri (10 µl) %1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. CYP1A2 ve 18S ürün bantlarının densitometrik analizi yapılmıştır.



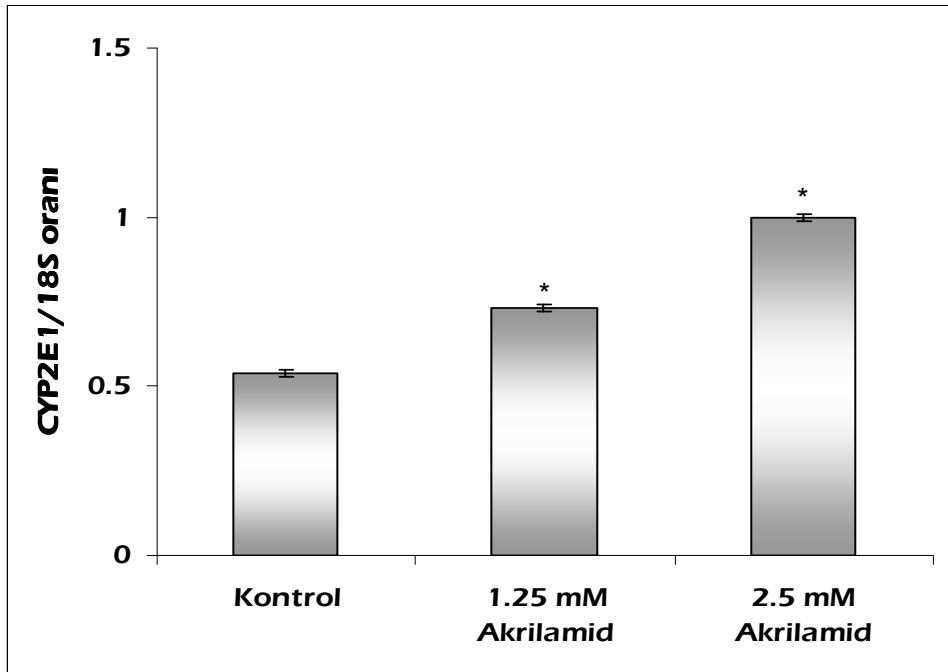
Şekil 3.9. Akrlamidin İnsan Karaciğer Hücre hattında CYP1A2 mRNA seviyesine olan etkisi. PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi ve 18S ile normalize edildi.

*: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.001$).

Tüm bunların yanı sıra CYP2E1 mRNA seviyesinin belirlenmesi için uygun koşulların optimizasyonu yapılmıştır. Bu izoformun mRNA seviyesinin akrlamid uygulaması sonucu nasıl değiştiğinin belirlenmesi için 32 döngü ve 61 °C yapışma sıcaklığı kullanıldı. Akrlamid uygulanması sonucunda CYP2E1 mRNA seviyesi konsantrasyona bağımlı bir şekilde arttı. 1.25mM akrlamid CYP2E1 mRNA seviyesini 1.35-kat arttırırken 2.5mM akrlamid uygulaması 1.85-kat arttırmıştır (Şekil 3.10 ve 3.11).



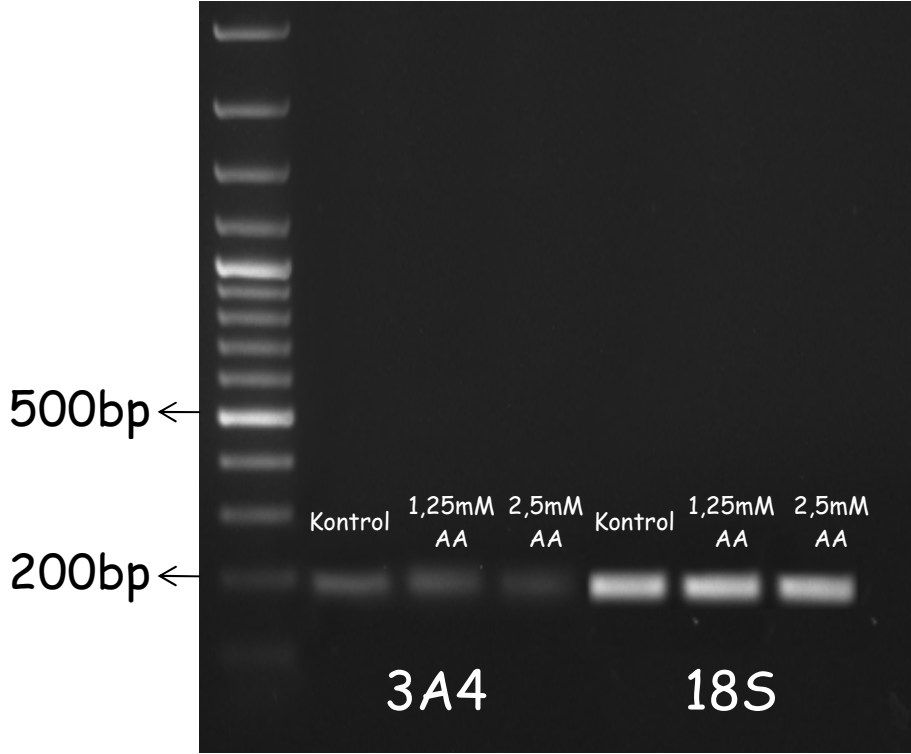
Şekil 3.10. Akrilamidin İnsan Karaciğer Hücre hattında CYP2E1 mRNA seviyesine olan etkisi. Internal kontrol olarak 18S rRNA geni kullanıldı. PZR ürünleri (10 µl) %1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. CYP2E1 ve 18S ürün bantlarının densitometrik analizi yapılmıştır.



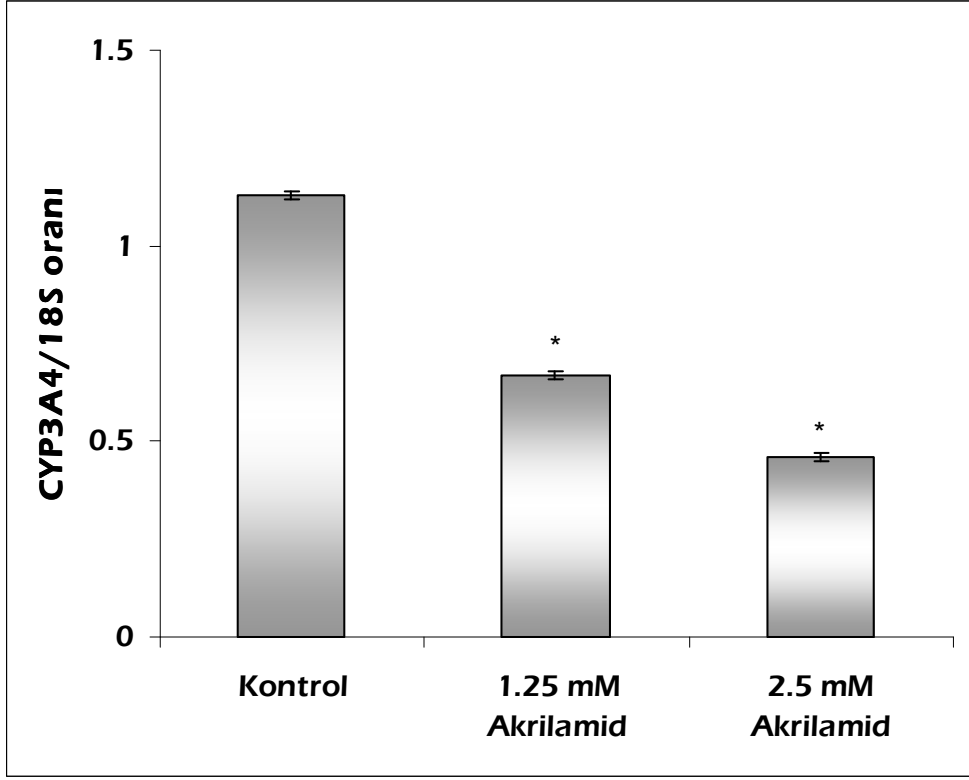
Şekil 3.11. Akrilamidin İnsan Karaciğer Hücre hattında CYP1A2 mRNA seviyesine olan etkisi. PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi ve 18S ile normalize edildi.

*: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.001$).

Akrilamid'in CYP3A4 mRNA seviyesinin belirlenmesi için uygun koşulların optimizasyonu yapılmıştır. CYP3A4 bantları 54,7 °C yapışma sıcaklığı ve 35 döngü kullanılarak elde edilmiştir. Akrilamid uygulanması sonucunda CYP3A4 mRNA seviyesi konsantrasyona bağımlı bir şekilde 1.25mM akrilamid konsantrasyonunun da 1.68-kat azalırken, 2.5mM akrilamid uygulamasında 2.45-kat azalmıştır (Şekil 3.12 ve 3.13).



Şekil 3.12. Akrilamidin İnsan Karaciğer Hücre hattında CYP3A4 mRNA seviyesine olan etkisi. Internal kontrol olarak 18S rRNA geni kullanıldı. PZR ürünleri (10 µl) %1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. CYP3A4 ve 18S ürün bantlarının densitometrik analizi yapılmıştır.



Şekil 3.13. Akrlamidin İnsan Karaciğer Hücre hattında CYP3A4 mRNA seviyesine olan etkisi. PZR bantlarının yoğunlukları Scion Image Software kullanılarak densitometrik analiz ile belirlendi ve 18S ile normalize edildi.

*: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.005$).

4. TARTIŞMA

Erken teşhis ve tedavideki yeni gelişmelere rağmen, kanser hala ölüm nedeni olarak ilk sıralardaki yerini son 20 yıldan beri korumaktadır. Bu yüzden hastalığı önlemek için kanser oluşumunda büyük pay sahibi olan sigara, alkol ve diyet gibi faktörler son yıllarda daha sık göz önünde bulundurulmaya başlanmıştır. Akrilamid insanların hem sigara ile hem de diyetle maruz kaldıkları, son yıllarda önemi çok artan bir kimyasaldır. Nörotoksik ve reproduktif toksik özellikleri bilinen akrilamid Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu (International Agency for Research on Cancer) tarafından 1994 yılında hazırlanan bir raporla “insanlar için potansiyel kanserojen madde”ler sınıfına dâhil edilmiş bir kimyasaldır (IARC, 1994). Bu karsinojenik etkiyi gösterebilmesi için akrilamidin karaciğer ve ekstrahepatik dokularda bulunan sitokrom P450 enzimlerinin (sitokrom P450’ye bağımlı ilaçları metabolize eden enzimler ya da sitokrom P450’ye bağımlı monooksijenazlar olarak da bilinirler) bir izozimi olan P4502E1 tarafından metabolize edilmesi gerekmektedir. Ancak, akrilamidin CYP2E1 enzimi ve diğer P450 izozimleri üzerine olan etkilerini araştıran çalışmalar sınırlı sayıdadır.

CYP2E1 bağılı anilin 4-hidroksilaz aktivitesi, immunoblot ve mRNA analiz sonuçları bu enzimin akrilamid uygulanması sonucunda insan karaciğer kanser hücrelerinde (HepG2) arttığını açıkça göstermektedir. Benzer sonuçlar sıçanlarla yapılan *in vivo* çalışmada da elde edilmiştir. (Barber ve ark., 2001). P4502E1 birçok düşük moleküler ağırlıklı toksik kimyasalın metabolizmasında rol aldığından son yıllarda çok önem kazanmış bir sitokrom P450 izoformudur. Bu izoformun benzen, karbon tetraklorür, ve nitrozaminler gibi birçok ksenobiyotiğin elektrofilik, mutajenik ve tümör oluşumuna neden olan metabolitlere dönüştürdüğü bilinmektedir. (Yoo ve ark., 1988; Guengerich ve ark., 1991; Mehlman, 1991; Nakajima ve ark., 1992; Yamazaki ve ark., 1992). Akrilamid’in maruziyet sonucunda CYP2E1’i artırması bu kimyasalın kendi metabolik aktivasyonunun yanı sıra benzen, nitrozaminler, *p*-nitrofenol, piridin vb. toksik kimyasallarında metabolik aktivasyonunu artırabilir. Bunun sonucunda akrilamide maruz kalmış kişilerde CYP2E1 tarafından metabolize edilen bu kimyasalardan kaynaklı kanser oluşma ve hepatotoksisite riski artabilir.

Bütün P450 izoformlarının içinde CYP1A (CYP1A1 ve CYP1A2) karsinojenlerin, mutajenlerin ve çevresel kirleticilerin metabolizmasında rol oynadığından öncelikli bir yer tutar. Bu iki üye potansiyel mutajenik olan benzo(a)piren, sigara dumanında ve mangalda pişirilmiş yiyeceklerde bulunan aromatik ve heterosiklik aminler ve poliaromatik hidrokarbonların metabolik aktivasyonunda rol oynarlar. (Adamson ve ark., 1996; Hümmereich ve ark., 2004; Kim ve Guengerich, 2005; Ma ve Lu, 2007). CYP1A'ya bağlı MROD ve EROD aktiviteleri ile bu izozimlerin protein ve mRNA seviyeleri iki değişik konsantrasyonda akrilamid uygulanması sonucunda HepG2 hücre hattında artmıştır. Bu çalışma akrilamid'in CYP1A1 ve CYP1A2 izozimlerini etkilediğini gösteren ilk çalışmadır. Bu izozimlerin akrilamid ile indüklenmesi sonucunda birçoğu karsinojenik, mutajenik olan benzo(a)piren, aromatik ve heterosiklik aminler ve poliaromatik hidrokarbonların metabolik aktivasyonunu arttırarak reaktif ara ürünlerin oluşumunu arttırabilir. Bunun sonucunda akrilamide maruz kalan insanların karaciğerinde organlarda toksisite, mutajenez ve kanser riski artabilir.

CYP2E1, CYP1A1 ve CYP1A2 izozimlerinin yanı sıra, akrilamidin CYP3A4'e bağlı eritromisin N-demetilaz ve CYP3A4 protein ve mRNA seviyelerine olan etkisi HepG2 hücre hattında belirlenmiştir. Bu çalışma, akrilamidin CYP3A4'e olan etkisinin belirlendiği literatürdeki ilk çalışmadır. Karaciğerde ve ince bağırsakta en fazla bulunan izozim olduğundan ve çok çeşitli ksenobiyotiklerin metabolizmasında rol aldığından dolayı, CYP3A4 önemli bir P450 izoformudur. Bu protein, antibiyotikler, yatıştırıcılar, kalsiyum kanal blokörleri, HMG KoA redüktaz inhibitörleri AIDS ilaçları ve analjezikler gibi piyasadaki ilaçların %50'sinden fazlasını metabolize eder. (Martin ve Krum, 2003; Arayne ve ark., 2005; van Herwaarden ve ark., 2005; Sica, 2006; Sugimoto ve ark., 2006; de Wildt ve ark., 2007; Klotz, 2007). Bu yüzden, akrilamid uygulaması sonucunda CYP3A4'ün değişmesi ilaç metabolizmasında bozukluklara ve klinik ilaç toksisitesine neden olabilir.

5. SONUÇ

Sonuç olarak yapılan çalışmada akrilamidin ilaçlar ve karsinojenler gibi birçok ksenobiyotiğin metabolizmasında rol alan P450 izozimlerinden CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1 ve CYP3A4'e olan etkisi belirlenmiştir. Akrilamidin CYP2E1, CYP1A1, CYP1A2 ve CYP3A4 izozimlerine olan etkileri ilk kez rapor edilmiştir ve bu kimyasal CYP2E1 ve CYP1A'ların indüksiyonuna sebep olurken CYP3A4'ü inhibe etmiştir. Akrilamidin ilaçları ve diğer ksenobiyotikleri metabolize eden enzimler üzerine etkisi göz önünde bulundurulduğunda bu maddeye olan maruziyetin azaltılması önem arz etmektedir. Bu sayede akrilamidin insanlarda sebep olabileceği organ toksisitesi, mutajenite ve karsinojenite engellenebilir.

6. KAYNAKLAR

Adamson RH, Thorgeirsson UP, Sugimura T: Extrapolation of heterocyclic amine carcinogenesis data from rodents and nonhuman primates to humans. Arch Toxicol Suppl 1996; 18: 303-318.

Adler, I.D., Baumgartner, A., Gonda, H., Friedman, M.A., Skerhut, M. (2000) 1-Aminobenzotriazole inhibits acrylamide-induced dominant lethal effects in spermatids of male mice. Mutagenesis 15(2), 133-136.

Arayne MS, Sultana N, Bibi Z. (2005) Grape Fruit Juice- Drug Interactions. Pak J Pharm Sci. 2005 Oct;18(4):45-57.

Arınç, E., Arslan, Ş., and Adalı O. (2005). Differential effects of diabetes on CYP2E1 and CYP2B4 proteins and associated drug metabolizing enzyme activities in rabbit liver Arch of Toxicol 79: 427-433.

Arınç, E., Arslan, Ş., Bozcaarmutlu, A. and Adalı O. (2007). Effects of diabetes on rabbit kidney and lung CYP2E1 and CYP2B4 expression and drug metabolism and potentiation of carcinogenic activity of N-nitrosodimethylamine in kidney and lung” Food Chem Toxicol. 45: 107-118.

Arinc, E. and Philpot, R.M. (1976). Preparation And Properties Of Partially Purified Pulmonary Cytochrome P-450 From Rabbits. J. Biol. Chem., 251:3213-3220.

Barber, D.S., Hunt, J.R., Ehrich, M.F., Lehning, E.J., LoPachin, R.M. (2001) Metabolism, toxicokinetics and hemoglobin adduct formation in rats following subacute and subchronic acrylamide dosing. Neurotoxicology. 22(3), 341-53.

Benet, L. Z., Kroetz, D. L., Sheiner, L. B. (1996) Biotransformation of drugs, in Hardman, J. G., Limbird, L. L., Molinoff, P. B., et al (eds): Goodman and Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th ed. New York, McGraw-Hill, 3—28.

Burke MD, Mayer RT. (1974) Ethoxyresorufin. Direct Fluorimetric Assay of a Microsomal O-Dealkylation Which is Preferentially Inducible by 3- Methylchlorthane. Drug Metab Dispos. 1974 Nov-Dec;2(6):583-8.

Cochin, J., and Axelrod, J. (1959). Biochemical and pharmacological changes in the rat following chronic administration of morphine, nalorphine, and normorphine. J. Pharm. Exp. Ther., 125: 105-110.

Edwards PM, Parker VH. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol Appl Pharmacol. 1977 Jun;40(3):589-91.

Evans WE, Relling MV (1999) Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. Science. 286(5439):487-91.

Exon, J.H. (2006) A review of the toxicology of acrylamide. J. Toxicol. Environ. Health. 9, 397-412.

Ey, P. L., and Ashman, L. K (1986) The Use of Alkaline Phosphatase-Conjugated Anti-Immunoglobulin and Immunoblots for Determining the Specificity of Monoclonal Antibodies to Protein Mixtures. Method in Enzymology., 121: 497-509

Friedman, M. (2003) Chemistry, biochemistry and safety of acrylamide. A review. *J. Agr. Food Chem.* 51:4504-4526

Ghanayem, B.I., McDaniel, L.P., Churchwell, M.I., Twaddle, C.N., Snyder, R., Fennel, T.R., Doerge, D.R. (2005a) Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts. *Toxicol. Sci.* 88 (2), 311-318.

Ghanayem, B.I., Wang, H., Sumner, S.C.J. (2000) Using cytochrome P450 gene knock-out mice to study chemical metabolism, toxicity, and carcinogenicity. *Toxicol. Pathol.* 28, 839–850.

Ghanayem, B.I., Witt, K.L., El-Hadri, L., Hoffler, U., Kissling, G.E., Shelby, M.D., Bishop, J.B. (2005b) Comparison of germ cell mutagenicity in male CYP-2E1-null and wild-type mice treated with acrylamide: Evidence supporting a glycidamide-mediated effect. *Biol. of Rep.* 72, 157-163.

Gonzalez, F. J., Yu, A.-M. (2006) Cytochrome P450 and xenobiotic receptor humanized mice. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46: 41-64.

Guengerich FP, Kim DH, Iwasaki M: Role of human cytochrome P450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxicol* 1991; 4: 168-179.

Hagmar, L., Törnqvist, M., Nordander, C., Rosèn, I., Bruze, M., Kautiainen, A. (2001) Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scand. J. Work Environ. Health* 27(4), 219-226.

Hong, J.Y., Pan, J., Gonzales, F.J., Gelboin, H.V., Yang, C.S. (1987) The induction of a specific form of cytochrome P-450 (P-450j) by fasting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 1077-1083.

Hümmerich J, Zohm C, Pfau W: Modulation of cytochrome P450 1A1 by food-derived heterocyclic aromatic amines. *Toxicology* 2004; 199: 231-240.

Jefcoate, C.R., Liehr, J.G., Santen, R.J., Sutter, T.R., Yager, J.D., Yue, W., Santner, S.J., Tekmal, R., Demers, L., Pauley, R., Naftolin, F., Mor, G., Berstein, L. (2000) Tissue-specific synthesis and oxidative metabolism of estrogens. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 95-112.

Johnson, K.A., Gorzinski, S.J., Bodner, K.M., Campbell, R.A., Wolf, C.H., Friedman, M.A., Mast, R.W. (1986) Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85, 154–168.

Kim D, Guengerich FP: Cytochrome P450 activation of arylamines and heterocyclic amines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 27-49.

Klaunig, J.E. (2008) Acrylamide carcinogenicity. *J Agric Food Chem.* 56(15), 5984-8.

Klotz U: Antiarrhythmics: elimination and dosage considerations in hepatic impairment. *Clin Pharmacokinet* 2007; 46: 985-996.

Klotz, U. (2007) Antiarrhythmics: elimination and dosage considerations in hepatic impairment. *Clin. Pharmacokinet.* 46, 985-996.

Kurebayashi, H., Ohno, Y. (2006) Metabolism of acrylamide to glycidamide and their cytotoxicity in isolated rat hepatocytes: protective effects of GSH precursors. *Arch. Toxicol.* 80, 820-828.

Kyhse-Anderson, J. (1984) Electrophoretic transfer of Multiple Gels. A Simple Apparatus Without Buffer Tank for Rapid Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.*, 10: 203-209

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.*, 227: 680-684.

Liska, D. J. (1998) The detoxification enzyme systems. *Altern. Med. Rev.*, 3(3): 18-198.

LoPachin, R.M. (2002). The role of fast axonal transport in acrylamide pathophysiology: Mechanism or epiphenomenon? *Neurotoxicology*, 23, 253-257.

Lopachin, R.M. (2004) The changing view of acrylamide neurotoxicity. *NeuroToxicol.* 25, 617-630.

Lu, A. Y. H., and Lewin, W. (1974). The Resolution and Reconstitution of the Liver Microsomal Hydroxylation System. *Biochem. Biophys. Acta.*, 344: 205-240.

Ma Q, Lu AY: CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 1009-1016.

Magnusson, M. O., and Sandström, R. (2004) Quantitative analysis of eight testosterone metabolites using column switching and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18 (10): 1089-1094.

Martin J.1; Krum H.2 (2003) Cytochrome P450 Drug Interactions Within The HMG-KoA Reductase Inhibitor Class: Are They Clinically Relevant. *Drug Safety*, Volume 26, Number 1, 2003 , pp. 13-21(9)

McLemore, T.L., Adelberg, S., Liu, M.C., McMahon, N.A., Yu, S.J., Hubbard, W.C., Czerwinski, M., Wood, T.G., Storeng, R., Lubet, R.A., et al. (1990) Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1333-1339.

Mehlman MA: Dangerous properties of petroleum refining products: benzene health effects. *Ramazzini Newsletter*, 1991; 3: 16-20.

Mottram, D.S., Wedzicha, B.L., Dodson, A.T. (2002) Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 419, 448-449.

Nakajima T, Wang RS, Elovaara E, Park SS, Gelboin HV, Vainio H: A comparative study on the contribution of cytochrome P450 isozymes to metabolism of benzene, toluene and trichloroethylene in rat liver. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 251-257.

Nash, T. (1953). The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* 55: 416-421

Nebert, D. W., and Gonzalez, F. J. (1987). P-450 Genes: Structure, Evolution and Regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, 56: 945-993.

Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., and Nebert, D. W. (1996). P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers, and Nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6: 1-43.

Oleksiak, M. F., Wu, S., Parker, Qu, W., Cox, R., Zeldin, D. C., and Stegeman, J. J. (2002) Identification and regulation of a new vertebrate cytochrome P450 subfamily, the CYP2Ps, and functional characterization of CYP2P3, a conserved arachidonic acid epoxygenase/19-hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 411(2): 223-234.

Parzefall, W. (2008) Minireview on the toxicity of dietary acrylamide. *Food. Chem. Toxicol.* 46(4), 1360-4. Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 40, 589-591.

Porter, T. D., and Coon M. J. (1991) Cytochrome P450, Multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 266(2 1):13469-13472

Rosen J. and Hellenas KE. (2002) Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst.* 127, 880-2

Schenkman, J. B. (1991) Cytochrome P450-Dependent Monooxygenase: An Overview, In molecular aspects of monooxygenases and bioactivation of toxic compounds, (Arinc, E. Schenkman, J. B. and Hodgson, E., Eds.), Plenum Press, NewYork, pp. 1-10.

Schettgen, T., Kutting, B., Hornig, M., Beckmann, M.W., Weiss, T., Drexler, H., Angerer, J. (2002) Trans-placental exposure of neonates to acrylamide – a pilot study. *Int. Arch. Occupat. Environ. Health* 77, 213–216.

Sica, D.A. (2006) Interaction of grapefruit juice and calcium channel blockers. *Am. J. Hypertens.* 19, 768-773.

Sivaraman, L., Leatham, M.P., Yee, J., Wilkens, L.R., Lau, A.F., Le Marchand, L. (1994) CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer. *Cancer Res.* 54:3692-3695.

Smith, C.J., Perfetti, T.A., Rumble, M.A., Rodgman, A., Doolittle, D.J. (2002) IARC Group 2A Carcinogens reported in cigarette mainstream smoke. *Food Chem. Toxicol.* 38, 371-383

Sörgel, F., Weissenbacher, R., Kinzig-Schippers, M., Hofmann, A., Illauer, M., Skott, A., Landersdorfer, C. (2002) Acrylamide: increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans. *Chemotherapy* 48,267–274

Stadler, R.H., Blank, I., Varga, N., Robert F., Hau, J., Guy, P.A., Robert, M., Riediker, S. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 2002; 419-449.

Sugimoto, K., Araki, N., Ohmori, M., Harada, K., Cui, Y., Tsuruoka, S., Kawaguchi, A., Fujimura, A. (2006) Interaction between grapefruit juice and hypnotic drugs: comparison of triazolam and quazepam. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 62, 209-215.

Sumner, S.C.J, Fennel, T.R., Moore, T.A., Chanas, B., Gonzales, F., Ghanayem, B.I. (1999) Role of cytochrome P4502E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 1116-1120.

Sumner, S.C.J, Selvaraj, L., Nauhaus, S.K., Fennel, T.R. (1997) Urinary metabolites from F344 rats and B6C3F1 mice coadministered acrylamide and acrylonitrile for 1 or 5 days. *Chem. Res. Toxicol.* 10:1152-1160.

Szotakova, B., Baliharova, V., Lamka, J., Nozinova, E., Wsol, V., Velik, J., Machala, M., Neca, J., Soucele, P., Susova, S., and Skalova, L. (2004) Comparison of in vitro activities of

biotransformation enzymes in pig, cattle, goat and sheep. *Research in Veterinary Science*, 76(1): 43-51.

Tareke E, Lyn-Cook B, Robinson B, and Ali SF. (2008) Acrylamide: a dietary carcinogen formed in vivo? *J Agric Food Chem*. 56(15), 6020-6023.

Tovey, E. R., and Baldo, B. A. (1987) Comparison of Semidry and Conventional Tank Buffer Electrotransfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Membranes. *Electrophoresis*, 8: 384-387

Tyl, R.W. Friedman, M.A. (2003). Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reprod. Toxicol*. 17, 1–13.

Tyl, R.W., Marr, M.C., Myers, C.B., Ross, W.P., Friedman, M.A. (2000) Relationship between acrylamide reproductive and neurotoxicity in male rats. *Reprod. Toxicol*. 14, 147-157.

van Herwaarden, A.E., Smit, J.W., Sparidans, R.W., Wagenaar, E., van der Kruijssen, C.M., Schellens, J.H., Beijnen, J.H., Schinkel, A.H. (2005) Midazolam and cyclosporin a metabolism in transgenic mice with liver-specific expression of human CYP3A4. *Drug Metab. Dispos*. 33, 892-895.

Wang, H., Napoli, K.L., Strobel, H.W. (2000) Cytochrome P450 3A9 catalyzes the metabolism of progesterone and other steroid hormones. *Mol. Cell. Biochem*. 213, 127-135. Werck-Reichhart, D., and Feyereisen, R. (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology*, 1 (6).

Yamazaki H, Oda Y, Funae Y, Imaoka S, Inui Y, Guengerich FP Shimada T: Participation of rat liver cytochrome P4502E1 in the activation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine to products genotoxic in an acetyltransferase overexpressing *Salmonella typhimurium* strain. *Carcinogenesis* 1992; 13: 979-985.

Yamazaki, H., Shimada, T. (1997) Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys*. 346, 161-169.

Yoo JS, Guengerich FP, Yang CS: Metabolism of N-nitrosodialkylamines by human liver microsomes. *Cancer Res* 1988; 88: 1499-1504.

Yousef, M.I., El-Demerdash, F.M. (2006) Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats. *Toxicology* 219, 13-141

Zhang, Y., Zhang, Y. (2007) Formation and reduction of acrylamid in Maillard reaction: a review based on the current state of knowledge. *Critical Revw. in Food Sci. and Nut*. 47, 521–542.

Zimniak, P., and Waxman, D. J. (1993) Liver Cytochrome P450 Metabolism of endogenous steroid hormones, bile acids, and fatty acids. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Schenkman, 3. B., and Greim, H., Eds.), Springer-Verlag Press, Heidelberg, Vol. 105, pp. 123–144.

